

超分辨成像有机小分子荧光染料研究

Research on small-molecule organic fluorescent dyes for super-resolution
imaging

博 士 后 姓 名 叶智伟

流动站（一级学科）名称 大连理工大学化学

专 业（二级学科）名称 应用化学

研究工作起始时间 2020 年 3 月 08 日

研究工作期满时间 2023 年 6 月 30 日

大连理工大学人事处（辽宁）

2023 年 6 月

内 容 摘 要

超分辨成像以超越光学衍射极限的分辨率，揭示了纳米分子尺度的细胞生理过程，正前所未有地变革生命科学的研究范式。荧光染料是这项技术实现的核心媒介，然而，掣肘问题是现有的有机小分子染料在单分子光物理性质（亮度、稳定性以及亮暗态转换速率等）具有明显缺陷，限制了超分辨成像技术的应用潜力。

本文基于有机合成小分子的通用性及易于拓展性，以单分子性能调控为理性内参，对荧光染料进行了设计开发。研究拓展超分辨成像显微镜的维度，扩大了染料荧光信息价值尺度；颠覆了传统自闪烁罗丹明的定义基准，形成新的自闪烁衡量标准；理性优化氟硼吡咯染料，发展兼具单分子追踪和定位功能的分子诊断染料；为亚硝基笼化策略罗丹明搭配生物正交标记体系，拓展活细胞超分辨成像的标记染料工具库。

本文的主要结论是：

1. 可基于光散射的多轴异性，工程化超分辨显微镜的单分子点扩散函数，实现轴向（Z）信息精准分析；
2. 利用自然邻位插入（natural neighbor interpolation），校正多色成像色差；
3. 破除自闪烁罗丹明染料的酸性解离常数（ pK_a ）决定论，提出以招募速率（ k_{rc} ）作为新的自闪烁评价标准；
4. 经过恰当取代基修饰的氟硼吡咯染料，具有平衡的单分子追踪和定位功能，可完成对活红细胞膜分子诊断；
5. 生物正交标记体系实现分子和标记的模块化设计，实现一种染料开发对多种标记物的超分辨靶向成像。

关键词：超分辨成像，单分子定位，有机荧光染料，罗丹明，氟硼吡咯

Abstract

Super-resolution imaging, which breaks the optic resolution limit and reveals the cellular metabolism at nano/molecular scale, is ongoingly transforming the research basis of biological sciences. The foundation of this technique is constituted on the sparse probing events from fluorescent dyes in both spatial and temporal. However, small-molecule dyes demonstrate sever limitation on their fluorescent single-molecule characteristics, which constitutes a bottleneck for pushing the frontier of super-resolution techniques.

This study aims to develop fluorescent dyes with synthetic adaptivity in context of single-molecule characteristic modulation. The new study expands both the spatial and spectral dimensions of super-resolution imaging to maximize the fluorescence information. The study also questions the conventional self-blinking determinant, and suggests a kinetic indicator for evaluating self-blinking behavior. To satisfy single-molecule localization and tracking, a bi-functional probe is constructed on the basis of boron dipyrromethene scaffold. Biorthogonal strategy is decorated to nitroso-caged rhodamine to provide a labeling toolbox for living-cell super-resolution imaging.

- Engineer of point spread function of super-resolution microscopy through astigmatism, to obtain the axial information.
- Correction on the pixel aberrations for two-color super-resolution imaging.
- Breaking the conventional determinant, i.e. acid disassociation constant (pK_a), of self-blinking. Suggestion on a kinetic rate, i.e. recruiting rate (k_{rc}) as the new self-blinking standard.

- Rational designed boron dipyrromethene adequate for single-molecule localizing and tracking.
- Module design through biorthogonal strategy on nitroso-caged rhodamine for super-resolution imaging multiplex targets.

Keywords: Super-resolution imaging, Single-molecule localization, organic fluorescent dyes, rhodamine, boron dipyrromethene

目 次

1	超分辨成像荧光染料概述	1
1.1	前言	1
1.2	超分辨成像原理	3
1.2.1	光场调制类超分辨成像显微镜	3
1.2.2	单分子定位显微镜	5
1.3	染料的核心功能	6
1.3.1	标记功能	7
1.3.2	荧光功能	9
1.4	成像染料进展	12
1.4.1	荧光团母体修饰进展	13
1.4.2	连接链进展	23
1.4.3	标记研究进展	27
1.4.4	研究进展总结	31
1.5	本文解决的问题	32
2	拓展单分子定位超分辨成像显微镜的维度	33
2.1	前言—维度拓展的必要性	33
2.2	可识别轴向信息的点扩散函数构建	34
2.3	双色超分辨成像色差校正	43
2.4	总结	48
3	酸性解离常数 (pK_a) 定义自闪烁?	49
3.1	前言—自闪烁罗丹明染料发展历史	49
3.2	面向自闪烁机制探索罗丹明染料设计	50
3.3	分子群体水平上螺环化动力学研究	52
3.4	单分子尺度螺环化动力学研究	53
3.5	碘酰胺罗丹明蛋白标签超分辨成像研究	59
3.6	总结	60
4	红细胞膜分子诊断	62
4.1	前言—红细胞膜超分辨成像的难点	62
4.2	适用于红细胞膜分子诊断氟硼吡咯染料设计	63

4.3	分子诊断探针单分子光物理性质研究.....	67
4.4	捕获红细胞微流控芯片.....	69
4.5	活红细胞膜的多维度超分辨成像及动力学分析.....	71
4.6	模型病态条件下活红细胞膜超微结构和动力学分析.....	74
4.7	总结.....	79
5	光激活亚硝基笼化罗丹明生物正交标记策略开发.....	81
5.1	前言—光激活策略在超分辨成像上的问题.....	81
5.2	可见光激活亚硝基笼化染料分子设计.....	82
5.3	亚硝基笼化罗丹明光谱性质研究.....	83
5.4	亚硝基笼化罗丹明单分子光物理性质研究.....	85
5.5	生物正交标记超分辨成像.....	87
5.6	总结.....	91
6	超越背景屏障的多维度溶酶体超分辨成像.....	92
6.1	前言—三维单分子定位的问题.....	92
6.2	超越背景屏障罗丹明溶酶体探针设计.....	93
6.3	超越背景屏障单分子定位信号.....	95
6.4	免洗活细胞溶酶体三维超分辨动态成像.....	97
6.5	总结.....	100
7	结论.....	101
	参考文献	103
	致谢	113
	博士生期间发表的学术论文, 专著	114
	博士后期间发表的学术论文, 专著	115
	个人简历	116
	永久通信地址	117
	附录	118
	高通量红细胞膜分子诊断研究.....	119

Table of contents

1	The concept of super-resolution imaging fluorescent dyes.....	1
1.1	Introduction.....	1
1.2	The principle of super-resolution imaging	3
1.2.1	Optical field modulated super-resolution microscopy	3
1.2.2	single-molecule localization microscopy.....	5
1.3	The core functions of fluorescent dyes	6
1.3.1	Labeling functionality	7
1.3.2	Fluorescent functionality.....	9
1.4	Recent progress of fluorescent dyes for imaging.....	12
1.4.1	Progress of fluorophore core decoration.....	13
1.4.2	Progress on linkers	23
1.4.3	Progress on labeling	27
1.4.4	Summary of research progress.....	31
1.5	Issues for this study.....	32
2	Expanding the dimensions of single-molecule localization super-resolution microscopy	33
2.1	Introduction: the necessity for expanding dimensions.....	33
2.2	Construction of a point spread function for extracting axial information...	34
2.3	Aberrations correction in two-color super-resolution imaging.....	43
2.4	Summary	48
3	Self-blinking is defined by acid disassociation constant (pK_a) ?	49
3.1	Introduction: the history of self-blinking rhodamine dyes.....	49
3.2	Self-blinking mechanism oriented rhodamine dye design	50
3.3	Kinetic study of spirocyclization equilibrium on the ensemble molecular groups.....	52
3.4	Kinetic study of spirocyclization equilibrium on single molecular scale ...	53
3.5	super-resolution imaging study on sulfonamide rhodamines through protein tag technology	59
3.6	Summary	60

4	Molecular diagnostics of red-blood cell membranes	62
4.1	Introduction: the challenges for super-resolving red blood cell membranes	62
4.2	Design of a boron dipyrromethene dye for imaging red blood cell membranes	63
4.3	Single-molecule photophysics of the probe for molecular diagnostics	67
4.4	A microfluidic chip for trapping red blood cells	69
4.5	Multi-dimensional super-resolution imaging ultrastructures and dynamics of living red blood cell membranes	71
4.6	Ultrastructures and dynamics of living red blood cell membranes under artificial stress condition	74
4.7	Summary	79
5.7	Advancing photoactivatable nitroso-caged rhodamines with biorthogonal labeling strategy	81
5.1	Introduction: the issues of photoactivation strategy for super-resolution imaging	81
5.2	Molecular design of photoactivatable nitroso-caged rhodamine dyes	82
5.3	Spectroscopic study of nitroso-caged rhodamines	83
5.4	Single-molecule photophysics of nitroso-caged rhodamines	85
5.5	Super-resolution imaging through biorthogonal labeling strategy	87
5.6	Summary	91
6	Surpassing the background barrier for multi-dimensional super-resolution imaging lysosomes	92
6.1	Introduction: the issues of three-dimensional single-molecule localization	92
6.2	Design of a lysosomal rhodamine probes to surpass the background barrier	93
6.3	Single-molecule signals surpass the background barrier	95
6.4	No-wash three-dimensional super-resolution imaging living lysosomal dynamics	97
6.5	Summary	100
7.5	Conclusion	101
	References	103

Acknowledge	113
Publications during application of doctoral degree.....	114
Publications during post-doc period.....	115
Personal resume.....	116
Permanent email address	117
Appendix	118
High-throughput molecular diagnostics of red blood cell membranes	119

符 号 表

$\lambda:$	光的波长
$n:$	介质折光系数
$\sin \theta:$	孔径角
$Fl:$	棱镜焦距 (mm)
$\text{erf}():$	误差函数 error function
$x, y, z:$	空间坐标
$x_0, y_0, z_0:$	分子在空间坐标原点
$N:$	光子数 (通常指单分子信号光子数)
$b:$	单分子信号背景噪音 (photons)
$\sigma_{x,y}:$	拟合信号高斯函数的 x、y 轴标准方差
$v_{\text{num}}:$	Voronoi 图节点, num 为标记节点序号
$w:$	自然邻近插入算法 Sibson 权重
$S:$	自然邻近插入算法分割多边形面积
$pK_a:$	酸性解离常数的负对数
$\text{pH}:$	质子浓度的负对数
$\varepsilon:$	摩尔消光系数 ($\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)
$\Phi:$	荧光量子产率
$\Phi_{p1}, \Phi_{p2}:$	激活量子产率
$k_{E-a}, k_{E-b}:$	酸碱扰动开关环平衡转换速率
$k_{rc}:$	招募速率, 自闪烁罗丹明分子绝对开环速率
$k_d:$	单分子从亮态转换到暗态速率
$k_r:$	单分子从暗态恢复到亮态速率
$k_b:$	单分子漂白速率
$D, \bar{D}:$	扩散系数
$R^2:$	线性回归决定系数
$P:$	置信区间

1 超分辨成像荧光染料概述

1.1 前言

显微成像改变了人类认知的边界，加速了科学的研究进程。列文虎克 (Leeuwenhoek) 在 17 世纪发展了世界上第一台高放大倍数可见光显微镜，并利用这台显微镜首次发现了微生物，奠定了微生物学及细胞生物学构筑的基础。在近几百年历史中，科学的进程和重大突破，往往交织着显微成像技术的进化，例如 X 射线成像技术奠定了遗传物质脱氧核糖核酸 (DNA) 的双螺旋结构，光学显微镜揭示了细胞有丝分裂的过程。

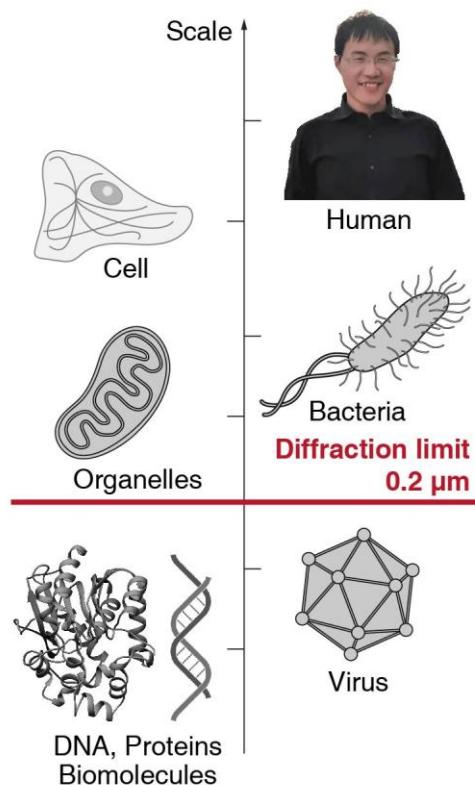


图 1. 光学衍射极限限制了光镜的分辨率

Fig 1. Light diffraction restricts the resolution of optical microscopy.
The plots of organelles, bacteria and virus were preprinted from 2014 Nobel prize.

然而，一朵乌云（图 1）始终笼罩着远场光学显微镜的发展：受限于光的衍射，光学显微分辨存在极限 $d = \lambda / (2n \sin \theta)$ ，其中 λ 是光

波长, n 为介质折光率, $\sin \theta$ 为孔径角。在可见光的尺度上, 显微镜二维分辨极限在 200-300 nm 左右。这极大限制了显微镜的解析能力, 阻碍了人们对于微观生命分子复杂机器的认知。

虽然电子显微镜、原子力显微镜等由于介质和成像方式转换, 可以超越普通显微镜的光学衍射极限, 获取分子、原子乃至化学键原位的信息, 但这些显微镜却避免不了对观察对象的严重扰动。通常而言, 这些显微镜需要对观测细胞样品进行化学/物理不可逆固定操作, 因而丧失了对于活体分子机器观察的可能性。

超分辨显微镜的发展突破了光学显微镜的分辨极限^[1-5], 拓展了观测的边界, 将可见光成像分辨尺度从微米推入纳米级别, 实现对分子的定位探测和解析。这类显微镜的进化前所未有推动生命科学认知的边界, 揭示神经细胞的轴突血影蛋白周期循环分布特征^[6], 内质网的片状结构^[7], 细胞核孔蛋白的组装模式^[8]等生物结构。为此, 2014 年诺贝尔化学奖颁给了为这项技术开发作出卓越贡献的三位科学家, Eric Betzig、William Moerner 和 Stefan Hell。

超分辨成像显微镜主要可以分为两种类型, 一种是基于光学调制, 利用光场的频率已知性, 结合对应的解析算法, 获取成像的高频率信息特征, 以得到超越分辨极限的成像结果, 这类显微镜包括结构光照明显微镜 (Structured illumination microscopy, SIM)^[4] 以及受激辐射损耗显微镜 (Saturated emission depletion microscopy, STED microscopy)^[9]; 另一种是基于荧光染料的单分子光学特征, 利用稀疏发光的分子信号, 结合点光源扩散函数, 获取超越光学极限的精准分子定位, 从而累加获取超分辨成像重构结果, 这类显微镜被称为单分子定位显微镜 (Single-molecule localization microscopy)^[1-3]。近年来, Hell 团队^[10]通过融合两种策略, 发展最低光通量显微镜 (Minimal photon fluxes microscopy, MINFLUX microscopy), 其分辨尺度可达到 1-2 nm。

每种显微镜的成像都对荧光染料及其标记性能提出了超越传统成像的需求^[11-14]。荧光染料作为核心的信息转换媒介, 其承担核心将标记分子、结构定位信息转换成光子信息的功能, 在特定情况下, 甚至可以通过光子的模态汇报其所处微环境、生物大分子界面的物理化

学特征。超分辨成像技术基于超越传统显微成像的高频信息需求，需要获取兼具高信噪比和稳定性的荧光光学信号，因而对作为传递媒介的荧光染料提出了在超近距离标记、单分子爆发能力、荧光稳定性乃至在稀疏单分子定位中亮暗态光转换功能的需求。

传统的荧光染料虽然在宏观整体尺度上具备有一定的亮度和稳定特征，但是在单分子层面，往往表现出不理想的爆发性、稳定性。超分辨成像显微镜需要染料研究者持续性开发具有强单分子荧光特性的染料分子。

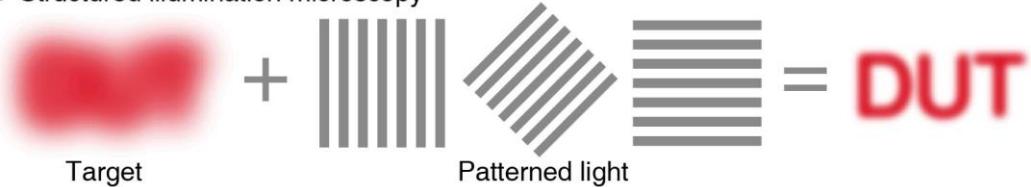
1.2 超分辨成像原理

超分辨成像依据其超越光学衍射极限的机制，可分为面对光场调制显微镜和面对染料单分子发光模式调制的单分子定位显微镜。其中前者通常具备有较为复杂的光学系统，通过对光场调制实现特定已知图形的激发光场，利用激发光场已知性赋予收集光子更高频率的分辨信息。而后者则需要获取随机稀疏化发光的染料单分子信号，通过特定的单分子点扩散函数来逆解析获取其定位特征。下面就两种显微镜的光学原理作详细论述。

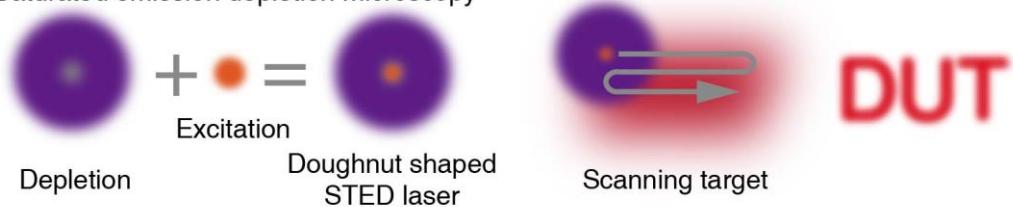
1.2.1 光场调制类超分辨成像显微镜

最经典的光场调制类超分辨成像显微镜是共聚焦显微镜，虽然它仅仅只能稍微提升超越传统宽场成像显微镜的分辨率。这类显微镜具有较为悠久的历史，最早可追溯至 20 世纪 50 年代，当时 Minsky 博士为克服神经细胞成像实验光学衍射的限制，在一篇专利中首次提出了共聚焦的理念^[15]。它的原理是于聚焦成像的背焦面点放置一定尺寸针孔，通过针孔尺寸大小调控激发光场尺寸并清除离域荧光信息的比例，从而实现分辨率相对提升。通过一对反射镜位移调控激发光照明位置，对样品选定区域进行点扫描，通过计算机数据处理转换实现完整的成像。然而，由于针孔对离焦光的限制，共聚焦成像信号显著弱于传统宽场成像，因而需要较强的激发光源、灵敏的光电二极管检测器以及具有强荧光发射的染料实现。为了提升成像的速率，研究者在后续发展了转盘式共聚焦显微镜^[16]、振镜共聚焦显微镜；而为了提升共聚焦成像分辨率，Zeiss、Olympus 公司引入了类似于结构光调制模块，并通过反卷积提升它们显微镜的分辨率^[17,18]。

Optical field modulated super-resolution microscopy
a Structured illumination microscopy



b Saturated emission depletion microscopy



c Single-molecule localization super-resolution microscopy

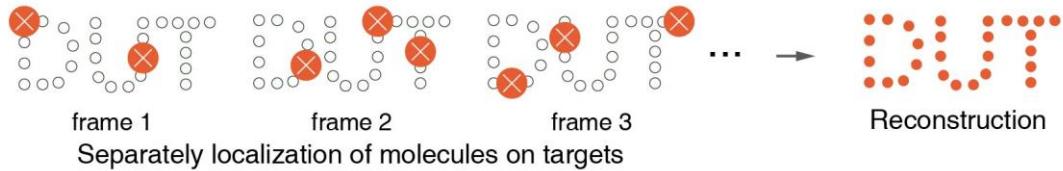


图 2. 超分辨显微镜的工作原理

Fig 2. Schematic illustration of the mechanism of super-resolution microscopy. The mechanisms of structured illumination microscopy (a), saturated emission depletion microscopy (b) and single-molecule localization microscopy (c).

如果将针孔的点限制转换成线，将光调制成为线性阵列，然后收集在二维平面不同角度结构光照明结果，通过傅立叶变换提取高频特征，即可实现结构光照明显微镜（图 2a）。这类是典型的现代通过光调制实现的超分辨成像显微镜，它们具有超越光学衍射极限 2 倍的分辨率，在水平方向可实现 100 nm 分辨率。这类显微镜的思想大约是在 20 世纪 90 年代形成，Gustafsson 的团队^[19]通过引入相同相位图像平均，以及权重计算方式，推动了结构光照明显微镜的完善。现阶段的结构光显微镜不仅通过线性结构光场实现二维成像，也可通过三束耦合光获取具有三维结构特征光场实现三维超分辨成像^[20]。通过非线性光照明，以及反卷积计算可以进一步突破 2 倍分辨率极限，实现 60-70 nm 甚至更高分辨率的超分辨成像^[21]。通过引入 Hessian 矩阵

构建二阶导数，并假定结构连续，可以实现超高速 (188 Hz) 的 88 nm 结构光超分辨成像^[22]。

如果再进一步将线性结构光调制成一种类似“甜甜圈”(doughnut) 形状，并结合点激发光源，将构成饱和激发辐射损耗显微镜^[23] (图 2b)。这种显微镜获得的特殊调制光场，其照明结构类似“甜甜圈”，中心具有超越衍射极限的纳米孔，利用压制光特殊波长 (通常使用 700-800 nm 光)，实现在孔外对荧光染料分子发射的抑制；而孔内的分子，由于处于没有压制光的影响，可被另外一束激光激发后实现光子发射。通过将压制光与激发光融合，逐点扫描样品最终可以实现超越衍射极限的分辨成像，成像的分辨率可以达到 40-50 nm。然而由于受激辐射的染料光子吸收效率显著低于荧光辐射过程，这类显微镜应用的压制光的功率很高^[24]，达到了 1~100 MW/cm²，对于活细胞层次成像是一个不利的因素。

1.2.2 单分子定位显微镜

在光场调制之外，研究者也发现利用荧光染料分子的随机光学闪烁过程可实现超分辨成像。在 2006 年，三个独立的课题组，Zhuang Xiaowei^[3]、Eric Betzig^[1] 和 Hess^[2] 团队独立发表了最初雏形的单分子定位超分辨成像显微镜，并且各自独立给予这类显微镜命名——随机光学重构显微镜 (Stochastic optic reconstruction microscopy)、光激活定位显微镜 (Photoactivation localization microscopy) 和荧光光激活定位显微镜 (Fluorescence photoactivation localization microscopy)。在很长一段时间内，这类显微镜被研究者赋予各类个性化特征名字，包括不限于点累积纳米形貌成像 (points accumulation for imaging in nanoscale topography, PAINT)^[25]、基态压制显微镜 (Ground state depletion microscopy)^[26] 等，但基于它们单分子定位的机制可以将这一类显微镜统称为单分子定位显微镜^[27]。

单分子定位显微镜的原理正如其名，通过对每个分子进行空间定位，然后累积定位信息可获取分子尺度的成像结果 (图 2c)。然而普通荧光染料以分子群体统一发光，难以解析单个分子的成像特征。为此，单分子定位成像需求具有光转换功能的荧光染料^[12,13]。这些染料的单分子发光模式上往往体现出稀疏可辨别的荧光光子爆发过程，形

成单分子点扩散函数而被后续定位解析。染料分子的荧光爆发过程可经由分子内结构热平衡转换、外加激活光实现，在特定分子设计（如螺环罗丹明）及特殊成像环境（除氧环境，高浓度巯基化合物条件）中，染料可发生多次的爆发过程。当一群这样特殊的分子聚集在一起时，持续观察它们的荧光信号会出现此起彼伏的闪烁特征，而可被收集识别和重构，实现超越可见光衍射极限的定位解析。

这类显微镜因为避免了调制光，因而其系统较为简单，具有光学系统复杂性较低的优势。由于可在普通宽场成像显微镜上成像，不需要额外的光场调制，因而单分子定位显微镜天然具有大视野场优势。同时，基于单分子定位方式完成的成像具有优越的分子尺度精确度，具有光调制超分辨成像不具备的优势。然而，单分子定位的机制对于荧光染料提出了极为苛刻的要求：这类染料需要具有稀疏化的单分子发光特征；且在后续数据处理上需极为精准的数学模型来描述其单分子点扩散函数^[28-30]，对整体分析算法、模型与硬件系统结合调试提出了极高的要求。在近年来的发展历程中，研究者不断挑战各类先进荧光染料合成，并尝试寻找单分子发光的规律，以求推进单分子定位超分辨成像显微镜的设计、发展和应用；光学研究者也不断改造显微镜单分子点扩散函数，以获取轴向以及多模态的特征信息，以求拓展成像显微镜的分析边界。

1.3 染料的核心功能

在超分辨成像技术中，荧光染料是承担信息转换的核心媒介（图3a）。染料的标记功能性，决定了荧光光子的信息价值（图3b）；而染料的荧光功能特性，决定了它成像能力的强度（图3c）。超分辨成像由于其更高的分辨率，对标记精确性以及荧光发光特性提出了超越传统显微镜的要求^[30]：首先，染料须在空间上尽可能接近标记对象，其间距应当小于成像的分辨率；其次，染料需要给出高信噪比信号，超越衍射极限的信息更易于受到背景噪音干扰。

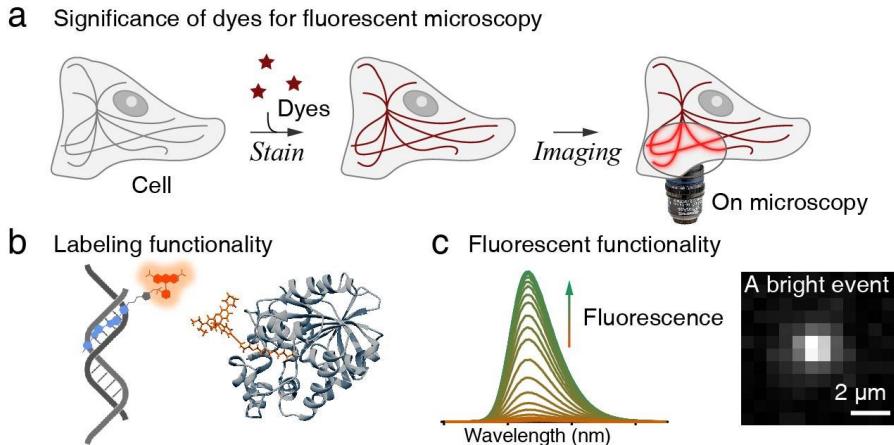


图 3. 染料的核心功能

Fig 3. Core functions of dyes.

(a) The transferring role of fluorescent dyes for microscopy. (b) Labeling dyes to biomolecules of interest. (c) Spectral increment and a single-molecule event as a result of molecular fluorescing.

然而,受限于物理标记方式的限制以及染料发光的局限性,传统的染料很难体现出满足超分辨成像需求的标记和荧光功能特质。传统小分子染色的对象不够清晰明确,往往只达到亚细胞器层次,其信息的价值也大打折扣。另一方面,传统染料的优秀荧光性质是基于分子群整体水准测量结果,而在单分子尺度上,这些染料分子发光特性很可能不利,不能够满足超分辨成像对于光子的需求。

下面将对染料这两项核心功能的变迁历史作阐述,并以此为依托,穿插介绍在超分辨成像中相关功能的要求。

1.3.1 标记功能

几乎所有的荧光染料分子都具有某种程度上的特定亲和力,这是由它们各自独有的分子轨道结构以及分子极化、构型变化特征决定的。研究者最关心的是如何能够开发新的染料并利用它们特殊分子亲和力,来实现对有价值标记对象的成像。

最为经典且高效的标记策略是染料直接染色,用荧光染料小分子对样品进行直接染色,然后寻找小分子可能具有靶向聚集的结构。这种方式利用了小分子染料的亲和力,但研究模式上需要大规模对染料进行筛选。应用这一策略的经典案例是线粒体染色剂罗丹明 123 及细

胞核染料 Hoechst 33258。

许多的新染料都展现出于细胞某些特殊位置的聚集特质，具有一定度标记功能。据此可总结出这一类染料的几个通用型模式特点。第一类是具有碱性基团染料分子，这类染料在酸性环境可质子化，并且质子化不影响或者增强发光，另外，质子化过程使染料分子脱离电中性，降低其脂溶性及膜通透性，易于出现溶酶体聚集效应^[31]。第二类染料，它们具有可以转换成阳离子构型或者双阳离子构型的分子结构，被线粒体内的腺苷磷酸负电荷吸引，因电荷诱导效应聚集于线粒体内膜附近，形成对线粒体一定程度着色^[32]。第三类染料，分子本身具有极强的刚性并且不易溶于大极性溶剂，这类染料如果具有合适插入磷脂双分子层的尺寸，一定程度上可能会倾向于细胞内各类磷脂膜结构疏水内层。但其在相应结构的停留染色，需要通过分子的双极性特质实现，其除了刚性并且烷基化亲和力强的结构部分，需要另外配置具有较强水溶性特质端基，实现对膜的停留染色^[33]。

荧光分子自身标记功能的最大问题是较差的可靠性，并且分子基本不可修饰，不是通用型标记设计策略。例如，罗丹明酰亚胺类染料因为其双阳离子盐发光团存在，具有线粒体靶向的内在特质，而同时由于其质子响应特性而具有对溶酶体的靶向特质；如果将它们修饰用来标记其它亚细胞器，往往面临对线粒体非特异性着色的竞争，从而削弱了其靶向能力。另一方面，染料的自身标记功能，往往与静电力吸引以及分子间作用力模式有关。当标记物因为特定生理过程而丧失了静电力依附的环境时，荧光分子就会离开标记物，从而出现脱靶现象，降低了荧光信号的可靠性。

为了解决这个问题，一种常用的策略是将与目标对象（生物大分子、亚细胞器结构）具有特异性强结合作用的小分子底物修饰到荧光染料，为避免这些靶向底物对荧光发射的影响，分子性能通常需要连接基团来调和。基于上述底物-染料分子设计，过去研究者和业界合作发展了一系列的商品化亚细胞器探针（例如，Thermofisher 公司的 Lysotracker 系列染料）^[34]。但是每种探针结构的独特性，无疑增加了合成步骤及复杂性；而连接基团的选择也往往影响最终的荧光性能，不恰当的连接链会造成脱靶效应，且降低染料水溶性和膜通透性，使

设计分子丧失细胞染色功能。

通用型的靶向底物有线粒体靶向特性的三苯基膦,溶酶体靶向特性的生物碱基团(如吗啉^[31]、哌嗪^[35]),功能酶抑制剂或者特定的多肽序列^[36]。但是研究者在选择恰当的抑制剂和多肽序列时,应当注意分子的尺寸比例以及构建新分子整体的膜通透性及水溶性特质,避免因荧光分子本身的非特异性亲和力过强,而丧失对底物的标记靶向功能。另一方面,这些配体本身也可能具有一定的尺寸,会造成最终成像尺寸偏离实际尺寸,或者因为配体连接基团的柔性,导致成像模糊。这类问题在传统成像中往往因为光的衍射极限限制而被掩盖,但在超分辨成像中因为分辨率提升,而成为成像准确度的显著干扰。

为了减少染料本身修饰标记基团的合成复杂性,“点击”(“click”)化学^[37]等生物正交标记被引入到探针分子设计中。这类正交反应包括四嗪-环辛烯/环辛炔的Diels-Alder环加成反应^[38-40],叠氮与炔的点击反应等^[37,41,42],这些反应均具有特异性,不易于与样本中其它活性基团发生污染性交叉反应。因为这种独特的特异性,可将正交标记对应的两个反应底物分别修饰到荧光染料和靶向分子上,从而实现荧光和标记功能的模块化设计。经由这类策略完成的染料,可以实现一次染料分子开发,对多种不同底物的标记成像。

标记功能是染料实现荧光信号价值的关键。超分辨成像解析获取的高分辨率染料位置信息,只有结合染料的精准标记,才能用于准确分析底物的结构、功能特性;反之,当染料不具有任何标记功能时,其超分辨成像结构仅仅从更高的精确度上反映了染料分子的随机分布,而不具备研究的价值。

1.3.2 荧光功能

染料的荧光性能是提供高信噪比成像信号的关键,具有持续性高强度荧光功能的染料总是稀缺的。由于传统成像的分辨尺度有限,每个像素单元体积内往往对应荧光分子群体,因而只需要这些分子整体具有一定的亮度和持续发光性,即可完成高质量成像。但在超分辨成像中,由于分辨率的大幅度提升,每个像素对应空间尺寸缩小,导致对于荧光团单个分子荧光性能的要求也变得越发严苛。假定每个坐标轴向的分辨率提升2倍,这样每个像素对应的二维空间尺度也减少为

1/4 (三维空间则为 1/8)，对应的荧光分子数量则对应减少为 1/4 (或三维空间中 1/8)。假定每个像素或者细节成像需求的信号数量保持不变，这样随着成像分辨率的提高，需求的荧光染料稳定性及亮度也大幅度提高。因为上述的原因，超分辨成像领域往往会采用成像稳定体系来维持染料的发光，并且采用极高的激光强度实现染料发光信号的倍增。

然而，一个核心问题是传统染料优化仅仅针对在分子整体尺度上的染料发光问题，忽视了其在单分子发光的独特性。在宏观上看起来整体均匀发光的染料，在其单分子发光上呈现出脉冲性以及大量无规则随机性。有一部分的染料会呈现出脉冲爆发的光学性质，从而出现极亮的单分子事件，而另一些染料则会呈现出波动的微弱单分子发光，几乎不能够被清晰分析。这些过程与染料分子的固有荧光团结构特点以及其荧光团周边的界面环境密切相关，因而使得适配于超分辨成像的染料极为有限且构筑超分辨成像探针的母体选择范围极为收缩。

对于单个染料分子而言，单分子发光的模式反映了染料分子在持续激发条件下处于不同能级状态的时间分布特征^[43-45]。如果一个染料分子能够在短时间内反复在基态 (S_0) 与激发态 (S_1) 之间被大量激发，那么它可提供丰富的光子信号，形成具有高亮度的单分子事件而被检测。相反，如果一个染料分子在被激发到激发态后，容易进入三重态或者持续时间更长，能量更低的某种亚稳态暗态，那么这个分子不易产生具有高亮度的单分子事件。如果两种特质能够同一分子上很好的融合，使得染料既具有在成像收集时间尺度内可被多次持续性激发的亮态，又具备持续超长时间 (> 10 s) 的亚稳态暗态，而呈现出闪烁特征。如此，多种相类似染料分子均处于这种亮暗态融合状态，则可在样本上呈现出持续闪烁特征和稀疏化单分子事件的发光特征，而满足单分子定位超分辨成像的需求。但具备上述特定单分子尺度发光特征的染料是稀有的。

虽然染料在单分子尺度上荧光出现异于整体光谱性质的情况，但分子群体集合的光谱特征仍然是与单分子尺度发光具有关联。两个核心评价染料亮度的光物理性质，即荧光量子产率和摩尔消光系数，阐释了分子吸收光子的能力和一次光子吸收转换成荧光发射的可能性。

这两项光物理性质也定义了单分子尺度发光的可能爆发强度极限，揭示了荧光染料的光子利用效率。因而，在定义染料的荧光功能时，这两者仍然是至关重要的核心参考要素。

另一方面，荧光染料的荧光特征与其分子结构和分子周围的界面、溶剂微环境密切相关^[46–48]。荧光团的母体结构决定荧光功能，寻找和发现提升荧光特性的分子修饰策略，挖掘探索新的荧光发射母体结构，具有持久的魅力，相关研究已纵贯整个近现代科学史。因为人们对染料科学持之以恒的探索加之受自然界天然色素结构启发，许多经典的染料母体被发现并广泛研究，其中杰出代表包括菁染料、罗丹明、香豆素、萘酰亚胺、氟硼吡咯等。在这些染料的荧光光谱及吸收光谱分析基础上，建立了现代溶剂极性化学和现代激光器的基础。

为了提升荧光功能，历史上研究者以光谱性质为基准，通过比较研究手段，对荧光分子结构的影响效应进行了深度研究。其中一些非凡的结果揭示了染料非辐射跃迁的可能发生过程，包括分子内扭曲电荷转移态（twisted intramolecular energy transfer, TICT）^[49,50]、光诱导电子转移（photon induced electron transfer, PET）^[51,52]等，而通过取代基电荷诱导效应设计或者空间位阻调控，可以对这些状态抑制从而实现染料荧光强度增强。

荧光染料除了本身的结构会导致荧光能力（发射光谱峰波长，半峰宽，量子产率，吸光效率等）的差异外，分子周围溶剂化环境及界面电场和磁场分布均有可能对荧光产生显著的影响。许多具备推拉电子体系染料^[53]在不同极性溶剂展现出完全不同程度红移的荧光峰，对应的斯托克斯位移（Stokes shift）也极有可能出现大幅度的变迁。染料的摩尔消光系数、量子产率也因溶剂效应不同，出现大幅的变迁。这些变化来源于分子的能级分布特征随着溶剂分子化效应变化，而出现变迁。在非极性溶剂中能量最低的构型和分子轨道，在极性溶剂中变为能量最高或次高的不利构型和轨道。这种分子轨道能级差异，最终呈现出荧光波长的移动以及荧光发射效率的变化。基于分子与环境相互作用的映射关系，可以探索分子探针的开发。典型的探针例子包括对于各类离子的检测^[54–56]，及对化学极性^[57]、粘度^[58]特征的探测分析。

但环境因素对荧光的干扰效应,为研究者带来了高性能荧光染料分子设计的挑战。一种染料不仅仅需要在体外表现出适合的荧光发射功能,在标记对象上也应当具有满足成像需要的发光能力。研究者或是寻求具有统一荧光效应的染料,这类染料荧光发射很少受到环境变迁影响,因而可以适用于在不同环境下对客体目标的检测成像;或是操控成像的介质环境,使得荧光染料在合适的体系中完成荧光发射。为解决荧光染料的发光性能问题上,在成像领域研究者这两个方向上做了许多的努力和尝试。其中,具有除氧系统还原性(巯基乙醇,巯基乙胺)或氧化性成像液体系被逐步发展成系统的配方,使得染料的荧光发射得以稳定^[59-62];研究者也通过大规模染料的研究,寻找到适用于蛋白标记成像的蛋白质界面环境的罗丹明染料(尤其是硅罗丹明染料^[63]),匹配自标签蛋白标签技术的成像需求。

微环境也对荧光染料的单分子尺度发光产生显著影响,主要干扰性质表现在单分子爆发脉冲特性和暗态的稳定性。这为超分辨成像荧光染料发展进一步提出了苛刻要求,使得研究者极难寻求通用型范式来发展新的染料。一个典型例子是,对于细胞核内与细胞基质成像,研究者在2011年^[64,65]就发现四甲基罗丹明通过SNAP-tag自标记标签蛋白可以非常有效对细胞核组蛋白进行单分子定位超分辨成像,但是当把标记对象由核内转移到核外时,四甲基罗丹明染料的成像性能大幅度削弱,并且很难形成持续性稀疏信号,使得活细胞基质亚细胞器成像困难。

总之,染料的荧光特性(亮度、稳定性)决定了其成像的潜力,并且受到分子结构、分子微环境的强烈影响。研究者需要通过对分子结构优化设计,寻求在目标对象上具有强烈荧光效应的染料实现超分辨成像。另一方面,在单分子尺度上染料的荧光发射展现出区别于宏观整体分子群的独特脉冲性和间歇亚稳定暗态特征,这些特征与结构的关系仍然不甚明确,有待于研究者以单分子尺度荧光效应进行构效关系研究。

1.4 成像染料进展

2020年之前超分辨成像荧光染料的总结报告可参见本人的博士论文绪论,为了精炼前言内容,本节聚焦于介绍2020年及之后的超

分辨成像荧光染料进展。

近三年进展基于分子结构改造位点的区别，可划分为三类：对于荧光团母体修饰、连接链修饰和标记修饰。对于母体荧光团修饰，研究者青睐的荧光团仍然是罗丹明及其衍生物，主要设计：通过取代基电荷诱导效应，调控罗丹明螺环平衡；对咕吨环 9 位置芳香取代基的替换；改变 2、7 位供体胺基电荷效应，调控光谱。而对于连接链修饰，研究者在确定三重态猝灭基团（环辛四烯，COT）机理及调控做了相当重要的工作。对于标记，尤其是蛋白标签，Johnsson Kai 研究团队在这三年做出了重要的突破，他们研究了标签蛋白的反应速率影响因素，并且从标签蛋白配体和蛋白本身结构突变出发，实现了以荧光寿命拆分完成的多色成像。从整体上看，近年来研究者取得的突破具有多样化特征，显示出百花齐放特点。

1.4.1 荧光团母体修饰进展

尽管多样化的染料母体被研究者尝试应用于超分辨成像荧光染料开发，最为热点的母体仍然是罗丹明染料。

（1）罗丹明染料的自闪烁平衡过程调控

这类染料具有极好的亮度以及稳定性，并且在热力学上分子的自开环平衡过程，具有强大的潜能来实现染料的免洗染色以及单分子定位超分辨成像功能。图 4 展示典型的罗丹明染料自开环平衡过程。闭环（ring-closed）状态下，罗丹明染料打破了母体结构的平面性，不具备可见光区荧光发射（关于闭环结构的相对较短波长吸收是否能诱导荧光产生，可参见刘晓刚教授课题组基于计算化学的相关探索工作^[66]），因而以这种形式在细胞和染色液中存在不会产生背景干扰，具备免洗染色可能性。同时，这种闭环结构也增加了罗丹明染料的脂溶性和透膜性，有利于加速罗丹明染料对细胞内靶标的标记过程。另一方面，在开环（ring-opened）状态，罗丹明咕吨环形成平面结构，重获可见光区强烈的荧光发射，同时由于这种状态染料分子表面局部带有正电荷，因而在此状态下具有更强的亲水性，减少了渗透交换出膜外可能性。

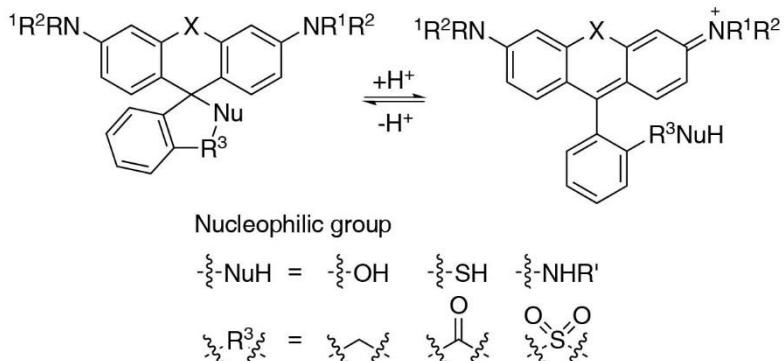


图 4. 罗丹明染料的自开环平衡过程。

Fig 4. The self-blinkable spirocyclization equilibrium of rhodamine fluorophores.

这种在亮暗态之间自发的热力学过程可同时满足标记过程对于清洁背景噪音需求和单分子定位成像的亮暗态闪烁转换需求,而被广泛研究。但是目前研究中只注重这类罗丹明染料的热力学平衡态,而忽视了动力学过程中开关环转换速率对于应用的影响。

在为超分辨成像技术发展先进罗丹明染料时, Johnsson 课题组^[67,68]注意到罗丹明染料的螺环平衡可以被其螺环取代基亲核性控制。当引入具有强吸电荷诱导效应的氨基、磺酰胺取代基,罗丹明的关环形式将占据主要存在形式,因而可以控制这类染料在染色时候的背景噪音。另外,基于前期对于卤代烷烃脱卤酶(haloalkane dehalogenase, Halo)蛋白标签(tag)与罗丹明染料的分子间互作研究(相关内容可见后节 1.4.3),他们认为这类增强闭环形式罗丹明染料在标记到蛋白表面后,受到蛋白表面亲水性电场影响处于开环形式,可实现免洗成像。为此,他们发展了一系列的 MaP 染料(图 5),这类染料均在螺环位置取代有强的吸电荷取代基,因强烈的吸电子诱导效应,关环状态被稳定,展现出较高的 D_{50} 值(染料荧光发射强度达到 50% 峰值时,对应的二氧化六环与水混合溶剂体系介电常数)。由于 Halo tag 蛋白与罗丹明强烈相互作用,在标记后, MaP 系列染料展现出显著的免洗成像性能,成像的信背比最高可达到 47 倍。利用这些染料,他们成功基于单分子定位超分辨成像解析了细胞核核孔结构,并且利用 STED 多色同时对细胞内微管和肌动蛋白成像,成像展现了良好的精确度。

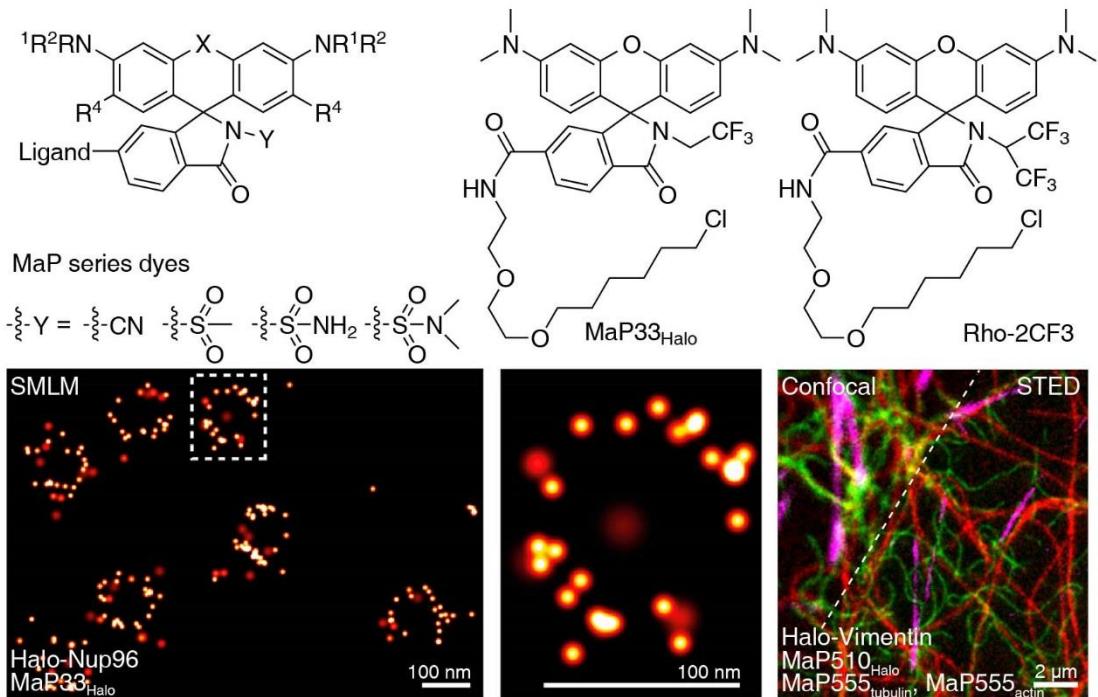


图 5. Johnsson 课题组发展的免洗自闪烁 MaP 系列染料^[67,68]

Fig 5. MaP series dyes for resolving nuclear pore complex and no-wash super-resolution imaging of tubulins and vimentins. Developed by Johnsson group^[67,68].

此后, Junfang He 与 Hongyan Sun 课题组^[69]也合作进一步对这类染料的免洗原理进行了探索。他们发现罗丹明染料螺环闭环形式的较强亲脂性,会在水溶液中产生聚集,进一步限制了这类染料开环过程,从而增强了染料的免洗成像效应。为此,他们也发展了一系列与结构相同或相似的罗丹明染料,并对它们在水中聚集与解离过程进行了定量分析。通过他们发掘的 Rho-2CF3 染料(图 5),可实现对 Halo tag 标签蛋白的免洗成像。

为了拓展自闪烁罗丹明染料多色成像功能, Schepartz 与 Bewersdorf 课题组^[70]协作发展了 Yale676sb 以及 Cal664sb 染料(图 6)。这两种染料的自开环平衡酸解离常数 pK_a 均小于 6, 这意味着这两种染料在生理 pH (7.0-7.4) 时, 大部分分子处于闭环的暗态, 可满足单分子定位成像稀疏性的需求。利用 Yale676sb 与先驱分子 HMSiR, 研究者展示了对线粒体和内质网双色超分辨成像。值得一提的是, Yale676sb 与 HMSiR 可用相同的 640 nm 激光激发, 但由于其发射光谱与 HMSiR 的差异性, 因而可以实现单一激发双色成像。

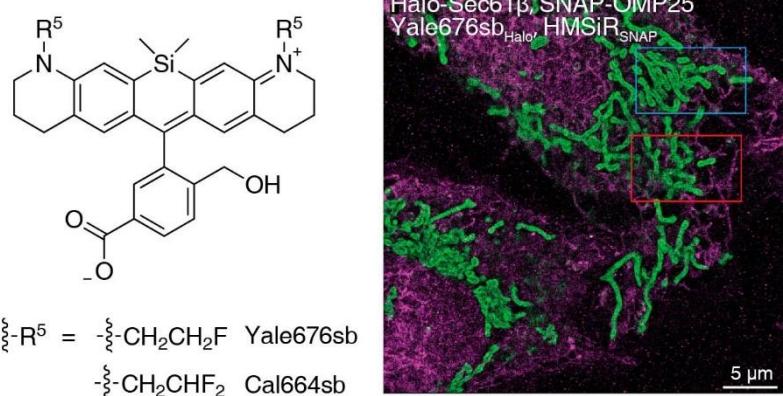


图 6. Schepartz 与 Bewersdorf 课题组发展的单一激发源双色成像长波长自闪烁染料^[70]

Fig 6. Self-blinking dyes for simultaneous one-laser two-color imaging of endoplasmic reticulum and mitochondria. Developed by Schepartz and Bewersdorf groups^[70].

与此同时,为了解决罗丹明染料透膜性问题, Lukinavičius 课题组^[71,72]尝试对螺环亲核取代基的邻位进行修饰。他们发现将羧基或者酰胺引入罗丹明螺环羧基邻位,将由于分子内氢键形成而稳定染料闭环状态,增强了罗丹明染料透膜性。更进一步的利用这种邻位效应,他们发展了更有效的芳香 Li 试剂,直接对呫吨酮进行亲核取代,实现克级罗丹明 NGERh 染料开发。利用这些染料,他们实现了对细胞的多色 STED 超分辨成像(图 7)。

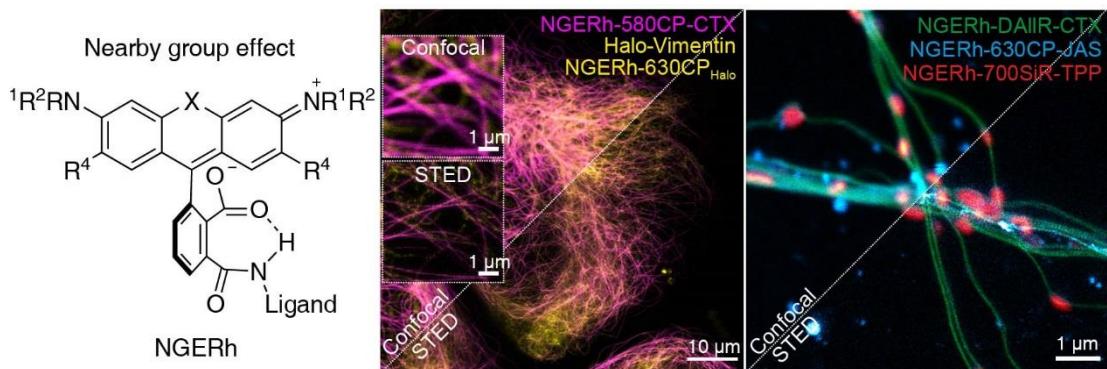


图 7. Lukinavičius 课题组发展的可应用于多色超分辨成像具有邻位增强效应的 NGERh 染料^[71,72]

Fig 7. NGERh fluorophores with nearby group effect for multi-color super-resolution imaging. Developed by Lukinavičius group^[71,72].

为了解决传统的自闪烁罗丹明染料只适用于中性 pH 环境的问题,徐兆超课题组^[72]发展了在酸性环境具有自闪烁特点的 LysoSR549 (图 8)。这种染料显示出 3.2 的 pK_a ,远远小于传统的自闪烁罗丹明,因而可在 $pH = 4 - 6$ 的酸性溶酶体中大量处于暗态。基于这种染料,他们成功对溶酶体进行追踪成像,并基于融合和解离形态学进行了溶酶体分类。

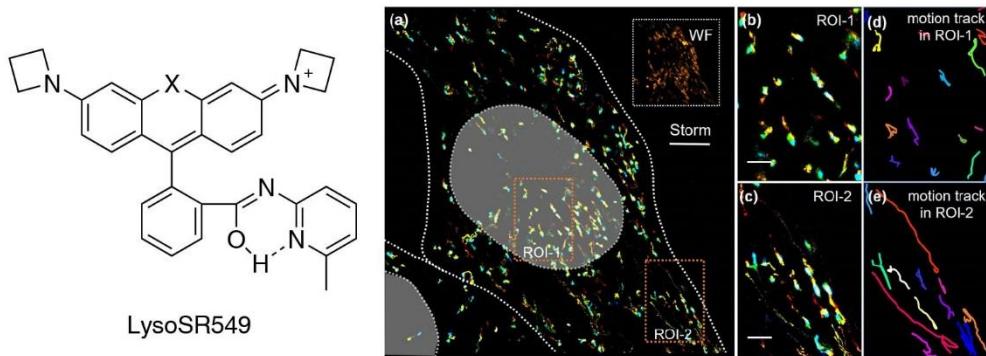


图 8. 徐兆超课题组发展的溶酶体自闪烁染料 LysoSR549^[72]

Fig 8. Self-blinking rhodamine for super-resolution imaging acidic lysosomes.
Developed by Zhaochao Xu group^[72].

(2) 罗丹明咕吨环 2, 7 位供体胺基修饰

对于大多数研究者而言,对供体胺基的修饰,可以有效调节染料荧光光谱波长,从而实现多色成像。对此,湖南大学 Yuan Lin 课题组^[73]则揭示了另外一种可能性,他们通过引入喹喔啉 (quinoxaline) 作为供体胺基,增加了在激发态的内转换过程能量消耗,从而发展了具有大斯托克斯位移 (Stokes shift) 的 YL578 染料 (图 9)。这类染料不仅具有大斯托克斯位移,同时还具有较好的亮度 ($\Phi = 0.74$, $\epsilon = 8.97 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)。利用这种染料,他们实现了对线粒体外膜的三维 STED 超分辨成像,以及对波形蛋白 (Vimentin) 的多色 STED 成像。

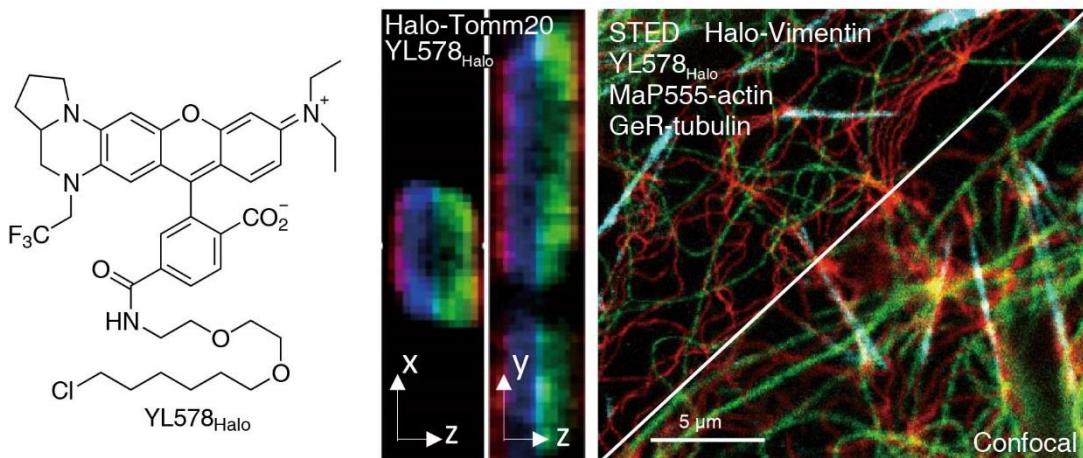


图 9. Yuan Lin 课题组发展的超大 Stokes 位移罗丹明 YL578 及其三维和多色超分辨成像结果^[73]

Fig 9. Large stokes shift dyes YL578 and their application in three-dimensional multi-color super-resolution imaging. Developed by Lin Yuan group^[73].

基于组织深度成像水溶性的需求, Gibbs 课题组^[74]对罗丹明染料的供体胺基进行了水溶性修饰。他们为呫吨环单侧的胺基添加了水溶性磺酸取代基, 并巧妙利用磺酸电负性中和了罗丹明的胺基正电荷, 从而制造出一类净电荷为 0 的 OregonFluor 染料 (图 10)。这类染料兼具水溶性和膜通透性, 可均匀对细胞内靶标进行标记, 例如他们的 Halo tag 与 SNAP tag 标签蛋白配体, 均可穿膜对细胞内表达 Halo 和 SNAP 融合蛋白进行标记。同时, 他们利用新染料为罗丹明同系物优势, 基于它们相似的非特异结合力, 利用在靶和脱靶双染料的比率成像, 精准在组织水平解析了药物靶标, 避免了脱靶信号的干扰。

Lavis 课题组^[75]也对他们开发的氮杂环丁烷取代 Jenalia Flour (JF) 染料进行了优化 (图 11), 他们用 2,2-双氟取代氮杂环丁烷发展了短波长的 JF479。新染料相比于用普通氮杂环丁烷染料具有更强的关环趋势, 因而可以实现更好的免除背景和免洗细胞核标记成像。另外, 他们在工作中还对染料呫吨环 9 号位芳香取代基进行了氟取代修饰, 增强了这类取代基的吸电荷诱导效应, 使得长波长的 JF 染料能从闭环的趋势中脱离, 更易于在标记后发生荧光。同时, 他们还发现 2, 3, 4, 5-四氟代苯基的 4 位置可进行亲核取代。利用氟取代基活性, 开发 JF669 染料, 实现了对线粒体和内质网的标记成像。

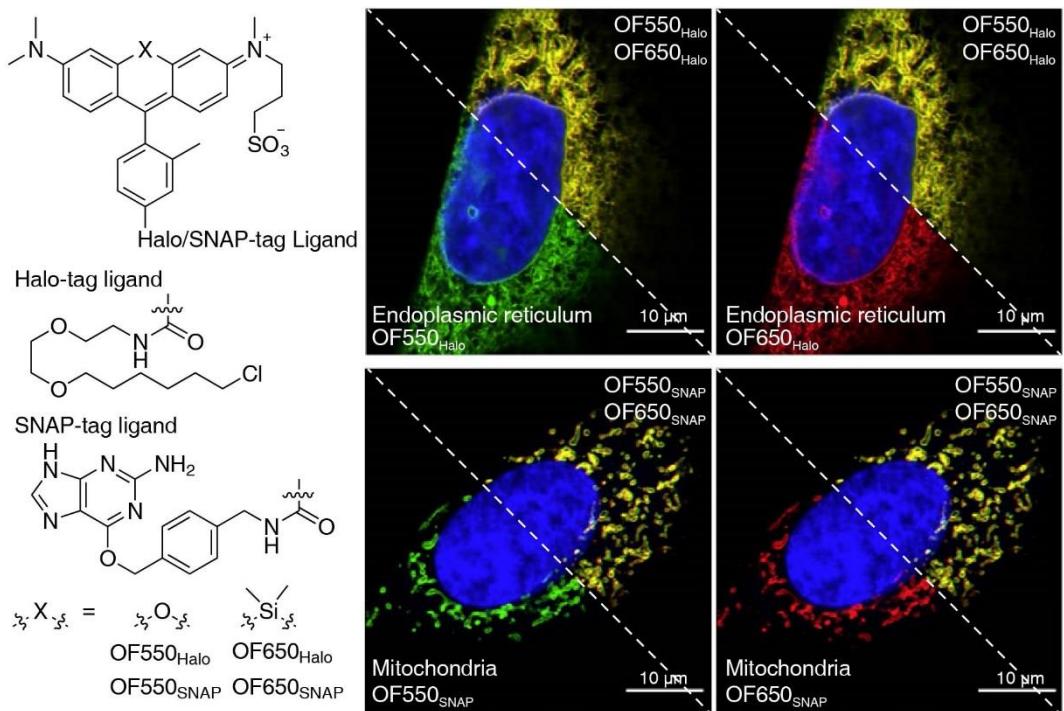


图 10. Gibbs 课题组发展的具备膜通透性和水溶性特征 OregonFluor 染料^[74]
 Fig 10. OregonFluor with membrane permeability and water solubility. Developed by Gibbs group^[74].

(3) 罗丹明咕吨环 9 位取代基修饰

罗丹明咕吨环 9 位芳香取代基的改变也会颠覆罗丹明染料的超分辨成像能力。Xu Ke 课题组^[76]基于对于商品化染料的成像研究, 发掘出可与 Alexa Flour 647 (AF647) 搭档配对的短波长 CF583 和 CF597 染料 (图 12)。相比较与传统的 Cy3B 或者 AF532, CF 染料在 AF647 成像液条件下, 仍然可实现大量的光转换闪烁过程, 给出足够的定位信息。基于质谱、H¹ NMR 以及 C¹³ NMR 研究, 他们提出 CF583 是基于罗丹明结构的商品化染料, 这种染料使用了咪唑替代了传统 9 位苯环, 一定程度上稳定了亚稳态自由离子态, 从而实现在 AF647 成像液下大量的光转换过程。利用 CF583 与 AF647 配对, 他们实现了对线粒体外膜和微管的双色三维超分辨成像。

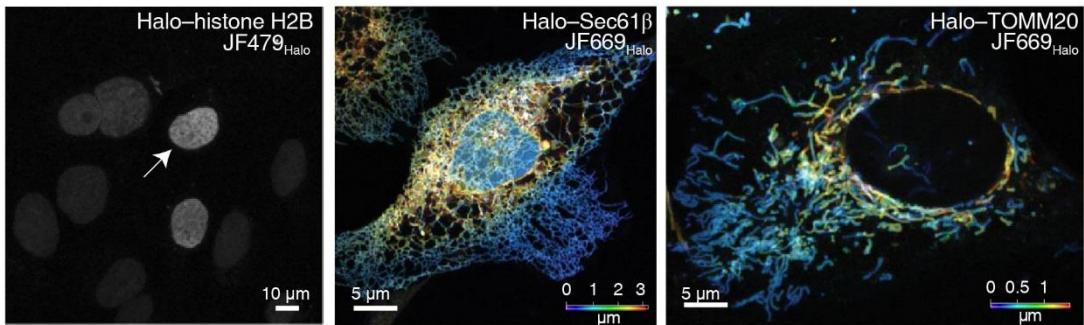
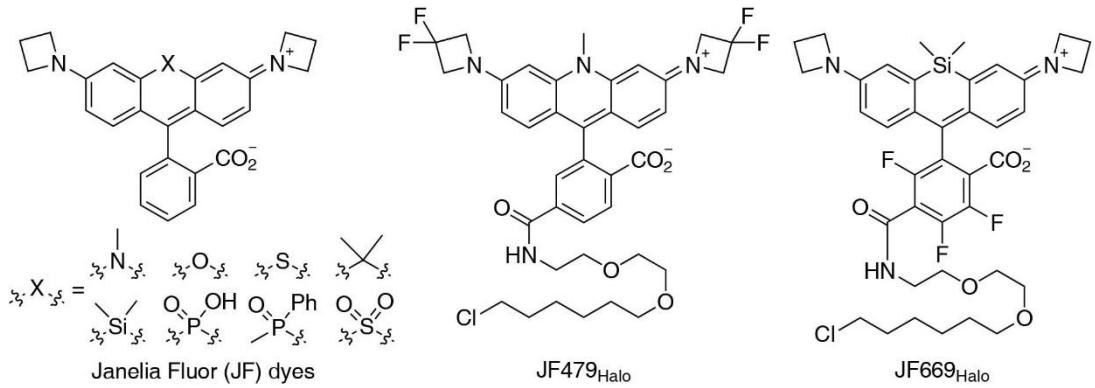


图 11. Lavis 课题组发展的 Janelia Flour 染料库^[75]
 Fig 11. Janelia Flour dyes library developed by Lavis group^[75].

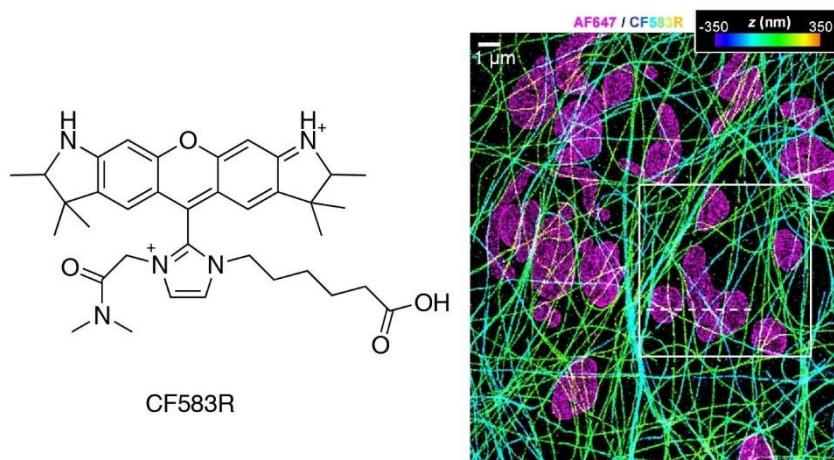


图 12. Xu Ke 课题组揭示的商品化 CF583 染料^[76]
 Fig 12. Commercial fluorophore CF583 revealed by Xu Ke group^[76].

Belov 课题组^[77]也对罗丹明咁吨环 9 位苯环进行了替换, 他们使用了吡啶取代基, 发展了 565pR 染料 (图 13)。利用新染料, 以及更早期的硅罗丹明染料, 他们实现了对果蝇的精子束多色成像, 揭示了

其中微管、核酸以及肌动蛋白相对空间分布特征。

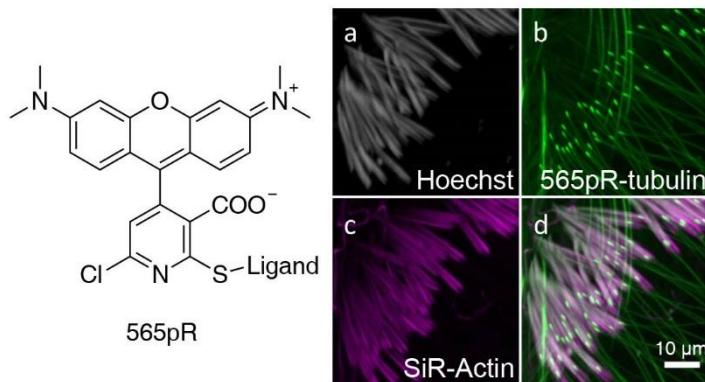


图 13. Belov 课题组发展的吡啶罗丹明 565pR 和对果蝇精子束成像^[77]

Fig 13. Pyridine based rhodamine 565pR for imaging spermbundles inside *Drosophila melanogaster* adult testis by Belov group^[77].

Bossi 和 Hell 团队^[78]合作替换苯环为噻吩，发展了 Thiophene SiR 染料（噻吩硅罗丹明，图 14），由于这类染料展现出极快的开关环过程，具有较短的亮态时长，可加速 MINFLUX 的成像过程。基于新染料的快速开关环过程，他们使用 MINFLUX 显微镜揭示了细胞核孔的超微结构。

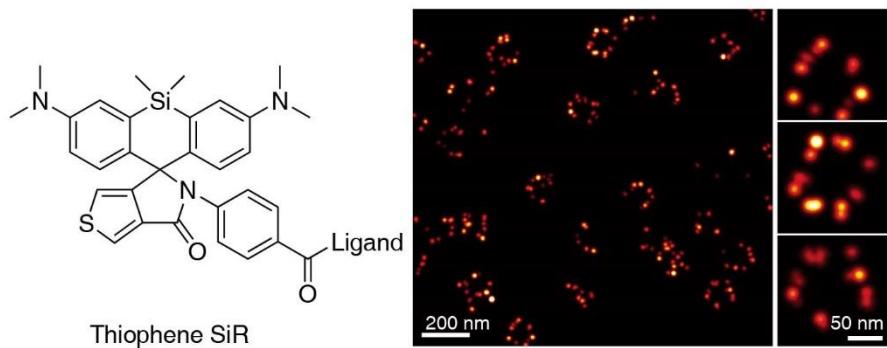


图 14. Bossi 和 Hell 团队合作发展的噻吩硅罗丹明^[78]

Fig 14. Thiophene SiR developed by Bossi and Hell groups^[78].

(4) 光激活策略的进展

光激活类染料因为稀疏性的分子提前设计，具有良好的超分辨成像潜质。这类染料的荧光信号可以在需求时给出，避免了染料整体荧光压制过程中不必要的光子牺牲；在激活光光强调控的情况下，光激活类染料易于实现稀疏单分子信号。为此，研究者始终在尝试发展新

的光激活分子设计策略，来满足超分辨成像对可控荧光发射的需求。

针对传统光激活策略的副产物毒性，Hell 团队^[79]在罗丹明咁吨环 4 号位衍生烯烃取代基，发展了新光激活 PaX 系列染料（图 15）。这种染料在氢质子和 405 nm 光激活条件下，可发生内环化转化反应，形成具有发色效应荧光团。利用这种新光激活染料，他们对细胞核孔进行了光激活单分子定位超分辨成像解析。解析结果清晰的展示了核孔的 100 nm 左右尺寸和核孔蛋白圆形分布特征。

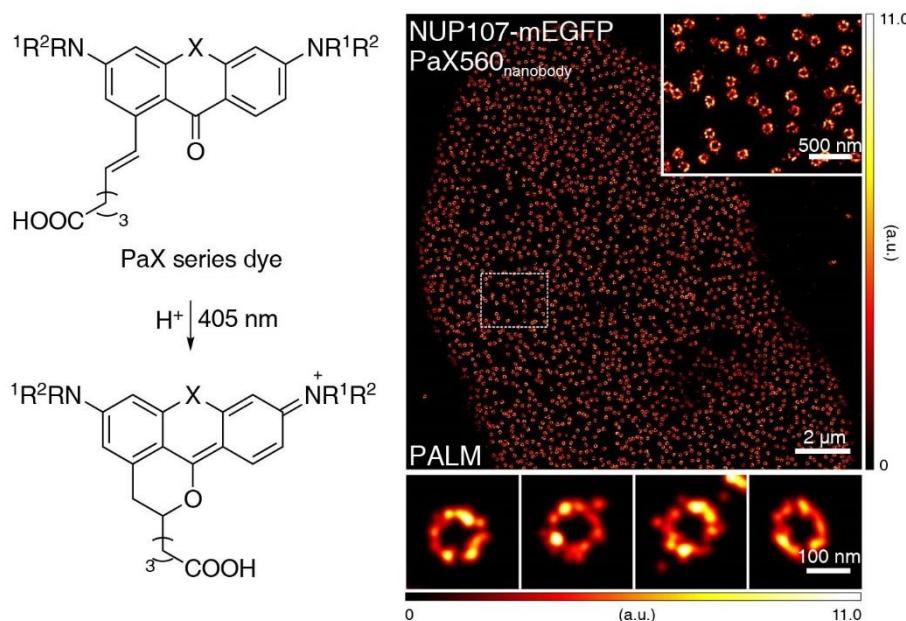


图 15. Hell 团队发展的无光激活副产物 PaX 系列染料^[79]

Fig 15. PaX series dyes photoactivated with no byproducts. Developed by Hell group^[79].

Hao, Xiao, Jiao 和 Zhang 团队^[80]合作发展了一种光激活氟硼吡咯二聚体 (SOD1, 图 16)。这类染料可在紫外光激活条件下，通过消除硫氧化物，发生二聚体转化，获取的新发色团呈现出 100 nm 红移的荧光发射，实现将原吸收发射光谱向远红可见窗口的转移。他们利用这种新染料实现了对于溶酶体的超分辨成像。

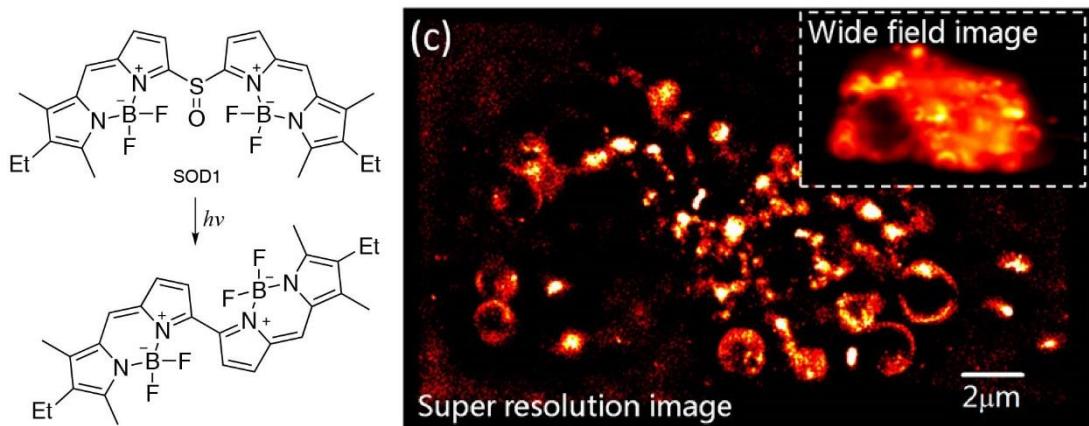


图 16. Hao, Xiao, Jiao, Zhang 团队合作发展的光激活氟硼吡咯二聚体^[80]

Fig 16. Photoactivatable boron dipyrromethene dimers developed by Hao, Xiao, Jiao and Zhang groups^[80].

1.4.2 连接链进展

连接链是染料母体与标记连接的部分。相比较与直接在荧光团母体上修饰取代基对于染料分子轨道的强烈影响，连接链似乎因为远离发色母体，很难直接对荧光过程产生干扰。但在真实世界中，连接链也可通过光激活电子转移、三重态电子转移和溶剂化效应，对染料的荧光功能产生显著影响。典型的一个例子即自修复（Self-healing）染料^[81]，这类染料在空间距离近处连接三重态猝灭剂（例如，环辛四稀），抑制其三重态的存在，从而避免活性氧产生而导致发色团母体结构氧化漂白。另一个例子，通过引入磺酸取代基^[82]，研究者发展了一类具备良好水溶性特征的氨基酸类似短连接链；通过该连接链的衍生，提升了染料分子的水溶性，实现对抗体等水溶性生物大分子多标记，满足高分辨率成像光子需求。

现代科学的研究中，最引人注目的连接链恐怕非生物正交标记模块莫属。基于模块化标记策略，生物正交标记将染料与标记配体的分子设计分隔，利用特异性的正交化学反应（通常是快速环加成反应），在生物体内将染料通过化学反应连接到靶标客体上。这类策略可实现染料荧光功能设计与配体标记功能设计分离，从而极大避免多次复杂有机合成过程，增强了染料的应用开发空间。为此，将 2022 年诺贝尔化学奖颁给了为这项技术发展作出杰出贡献的三位科学家，Carolyn Bertozzi, Morten Melder 和 Barry Sharpless。

四嗪-环辛烯/环辛炔体系是近年来发展最为迅速的生物正交标记体系,四嗪与环辛烯或环辛炔在生物体内可进行超快特异的环加成反应,且四嗪具有一定度荧光猝灭效应,有利于实现免洗染色成像。然而,四嗪的猝灭效应受到染料吸收波长影响,对于红外发光等长波长染料,四嗪猝灭效应明显削弱。为此, Herten 与 Wombacher 团队^[83]协作,从罗丹明咕吨 9 位苯基础法,从邻位修饰超近距离的四嗪基团,设计出染料 sb-HD656 (图 17)。由于四嗪距离荧光团母体距离相较于过去设计分子更近,光激活电子转移可能性增加,新染料展现出增强的荧光猝灭特征。基于这类新染料与环辛炔鬼笔环肽的正交标记,作者实现了对细胞肌动蛋白的超分辨成像 (基于光波动机制, super-resolution optical fluctuation imaging)。

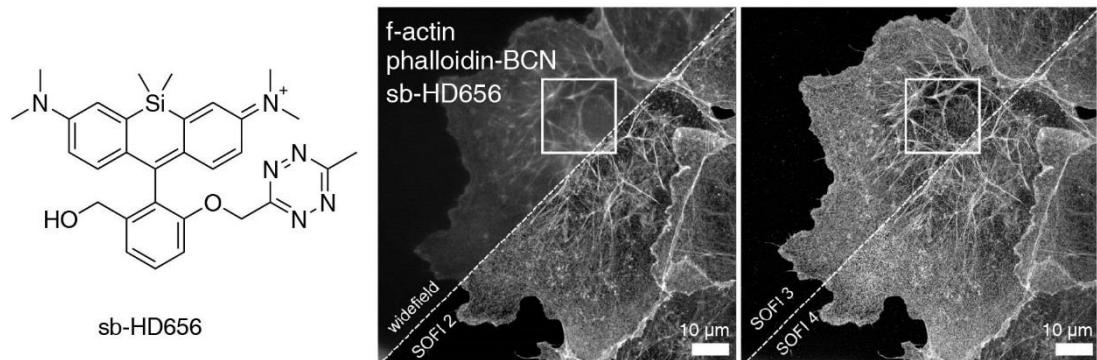


图 17. Herten 与 Wombacher 团队协作发展超近距离四嗪硅罗丹明, 通过空间尺度控制, 增强了四嗪对长波长罗丹明染料猝灭效应^[83]

Fig 17. Spatial nearby tetrazine silicon rhodamine (sb-HD656) with reinforced quenching effect. Developed by Herten and Wombacher groups^[83].

对于自修复染料,很长时间以来研究者都认为环辛四烯对于染料三重态猝灭基于分子碰撞机制^[84]。然而, Blanchard 对于环辛四烯以及酰胺取代环辛四烯的研究表明,环辛四烯对于三重态猝灭很有可能与三重态电子转移密切相关 (图 18)^[85]。他们的这个工作对于环辛四烯在基态和三重态构型进行了探讨,他们认为环辛四烯在三重态的 8 个电子可形成 Baird 芳香性,因而避免激活氧气分子三重态,从而抑制荧光团的漂白。同时,他们基于酰胺等吸电子取代基对环辛四烯的三重态跃迁能量的影响研究,发现如果环辛四烯具有与荧光团母体相近的三重态跃迁能量,则其三重态电子转的效率因 Fermi 黄金规则

(能量越接近, 跃迁可能性越大) 提升。基于上述研究结果, 他们发展了 Cy3-4S-AC 以及 Cy5-4S-AC 系列自修复染料, 这些染料相比于传统环辛四烯自修复染料展现出更强的单分子尺度荧光特性, 适用于单分子荧光研究。然而, 他们的设计思路不能够完全预测环辛四烯的三重态猝灭效率, 比如具有两个酰胺取代基的环辛四烯, 其三重态跃迁能量与 Cy3 更为接近, 然而它与 Cy3 结合的自修复染料, 并没有展现出更优势的抗漂白荧光特性。这些结果说明自修复策略的复杂性, 不能仅仅依赖于能级以及 Fermi 规则预测染料的自修复特性。

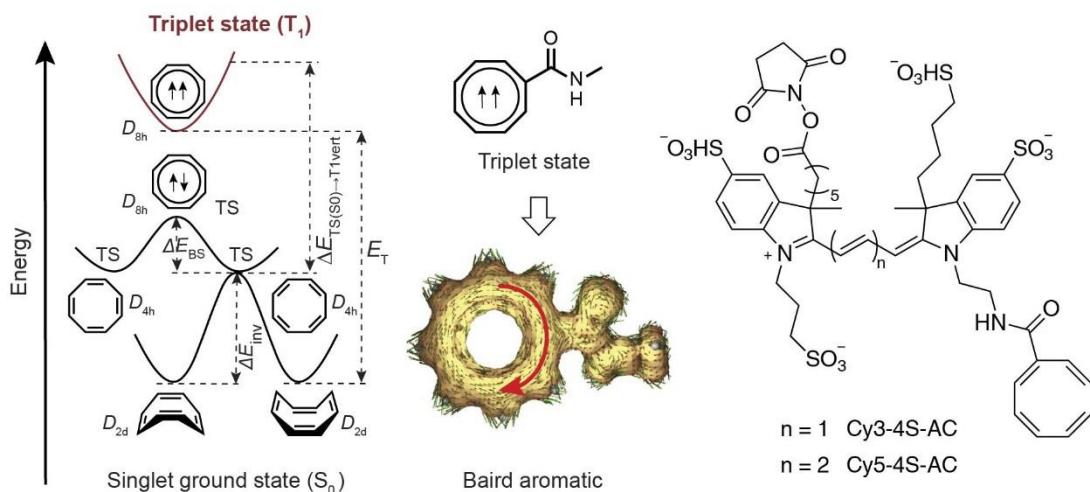


图 18. Blanchard 团队对于环辛四烯 (COT) 增强染料自修复机制研究^[85]
Fig 18. The self-healing mechanism of cyclooctatetraene (COT) studied by Blanchard group^[85].

然而, 自修复染料另一个核心问题是三重态猝灭基团引入, 占据了染料修饰位点, 从而无法为染料再增加标记功能。为此, Herrmann 与 Cordes 合作^[86], 发展了一种万能自闪烁染料连接链 L20 (图 19)。这种连接链不仅提前修饰有三重态猝灭剂基团, 例如环辛四烯, 同时还具有化学反应活性的生物正交标记炔底物和马来酰亚胺基团。利用该连接链, 可将染料和标记底物 (如二抗) 连接, 同时保留三重态猝灭基团。通过这个策略, 他们为 ATTO647N 增加了自修复功能, 具有 L20 连接链染料展示出比原始染料显著增强的光稳定性。为此, 他们进一步将这个染料标记到微管蛋白二抗上, 利用增强的光稳定性实现了 STED 超分辨成像, 解析了微管的纤维状结构。

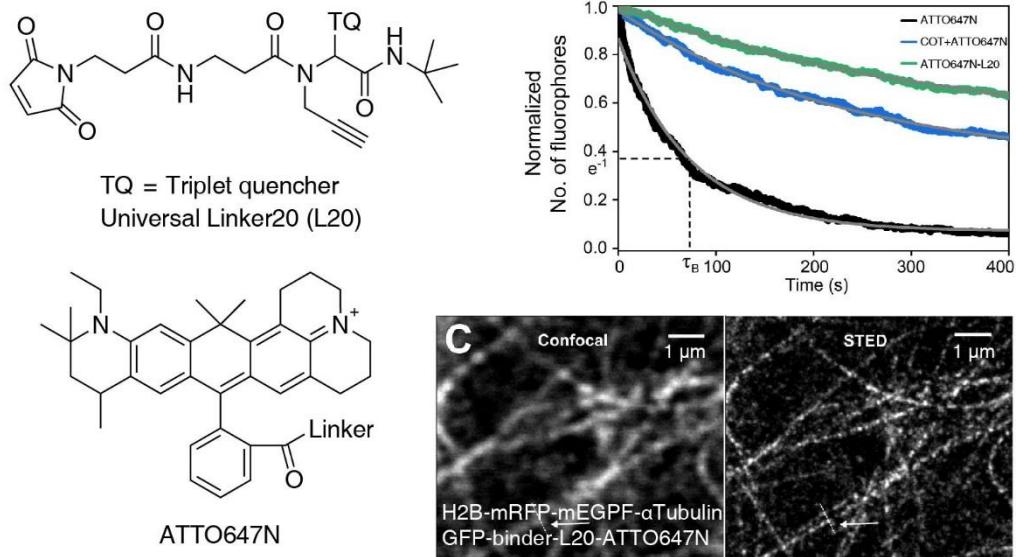


图 19. Herrmann 与 Cordes 团队协作发展的万能自修复染料连接链^[86]

Fig 19. Linker unit with universal functionality for construction of self-blinking dyes.
Developed by Herrmann and Cordes groups^[86].

不恰当的连接链,可能因为光激活电子转移及非辐射跃迁分子振动过程,影响染料母核的亮度。一个典型例子是 Cy5 染料,这种染料通过对马来酰亚胺的 Michael 加成连接到蛋白裸露巯基时,因为连接链酰亚胺对荧光团母体的影响,Cy5 染料的单分子总收集光子数(Photon budget)总低于通过酰胺方式连接染料的单分子总收集光子数。为此,Chen Zhixing 和 Chen Chunlai 课题组^[87]合作在 Cy5 染料上对已知的巯基连接链策略进行了单分子光物理性质研究,他们发现苯基氧杂二唑(phenyloxadiazole, POD)连接链衍生的 Cy5 染料在标记巯基后,仍然可以很好的保留原始 Cy5 染料的单分子总光子数。同时,他们发现 POD 标记策略保持有对巯基的选择性和高效标记功能,因而他们认为这类 POD 连接链构筑的 Cy5 染料将可以有效应用于荧光共振能量转移(Flourescent resonance energy transfer)以及 STED 超分辨成像实验。

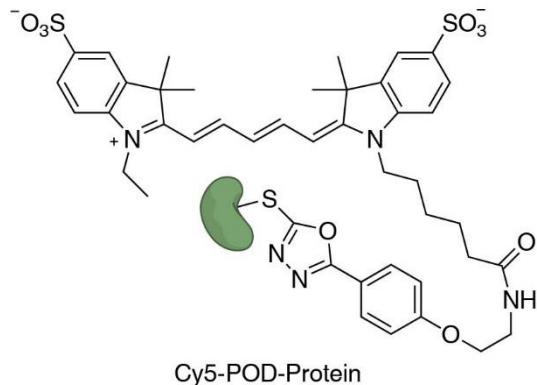


图 20. Chen Zhixing 和 Chen Chunlai 团队协作寻找到提升 Cy5 染料单分子总光子数巯基连接链^[87]

Fig 20. A thiol conjugation linker unit with enhanced total photon budgets for Cy5. Developed by Chen Zhixing and Chen Chunlai groups^[87].

1.4.3 标记研究进展

除了荧光团母核和连接链外,标记对象也会对染料的荧光特征产生很大的影响,尤其是当染料与标记对象界面产生强烈的相互作用时,这种影响更是至关重要的。同一种染料,往往因为标记到不同位置产生决然不同的光物理性质,这种效应不利于满足超分辨显微成像的极高品质光子需求,影响了染料的成像应用。蛋白标签标记策略^[88,89]有效的减少了研究者对染料荧光表现的担忧,这类策略使用细胞内源性表达的蛋白酶,特异性与连接有蛋白标签底物染料进行自标记酶催化反应,实现对融合蛋白标记。这种标记提供了稳定的蛋白质表面界面环境,使得染料荧光发射很大程度免于受外界影响。同时,基于融合蛋白种类的多样性及基因编辑可行性,蛋白标签策略可满足多样化标记成像需求。

近三年来,以 Johnsson 为代表的研究者集中致力于蛋白标签策略的改良^[90-93]。Johnsson 团队首先对标签蛋白 Halo 和人源鸟嘌呤烷基化转移酶 (O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase, SNAP) 的自标记反应动力学进行了详细研究(图 21)^[94]。他们的结果显示, Halotag7 (一种广泛使用的 Halo 配体蛋白) 具有比 SNAP tag 标签蛋白更快速的反应动力学。基于他们对染料标记后蛋白的晶体表征,他们发现罗丹明类染料与 Halotag7 蛋白间具有较强的亲和吸引力,这种作用力驱动了罗丹明类染料与 Halotag7 蛋白间的快速酶连反应。他们还发

现这种作用力存在于罗丹明开环的两性离子 (zwitterion) 亮态, 而非闭环的螺环染料暗态。

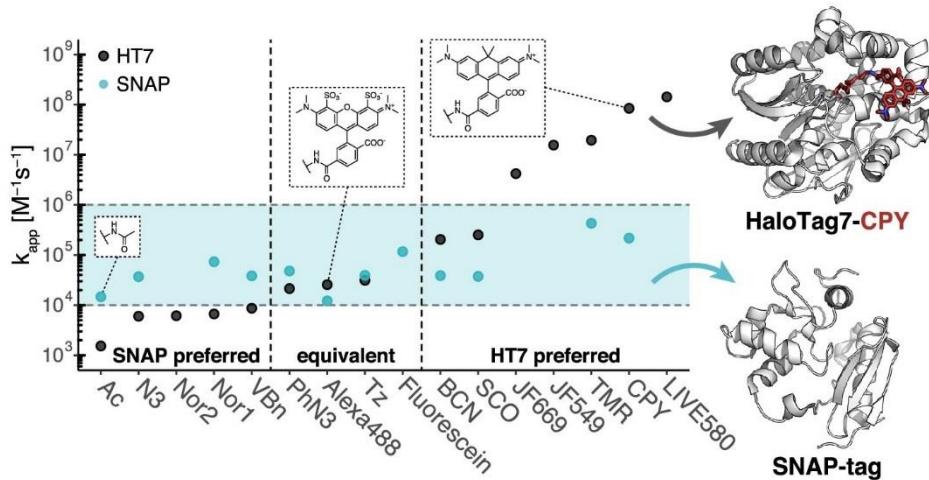


图 21. Johnsson 团队对标签蛋白和配对底物的标记动力学研究^[94]

Fig 21. A study on the labeling kinetics between self-labeling protein tags and their ligands. Performed by Johnsson group^[94].

基于这种亲和力的认知, Hoblot 和 Johnsson 团队^[92]协作进一步调整了 Halo 蛋白配体的结构, 使得适用于 Halo-tag 蛋白标签的罗丹明染料不再不可逆标记到 Halo 蛋白上, 发展了一种可交换的蛋白标签策略 (图 22)。通过染料可逆的交换结合过程, 极大减少了成像过程染料光漂白的影响, 延长了超分辨成像的时间窗口。基于这种新探针, 他们实现了对于神经原细胞膜的组织三维 STED 超高分辨成像。另外, 他们在工作中还对 Halo 蛋白 Asp106 氨基酸进行了突变, 配合配体卤代烃向醇转换, 可以实现对线粒体和溶酶体的多色 PAINT 成像。

利用这一系列的染料, Glogger 和 Heilemann 团队^[90]协作进行了更多颜色的 PAINT 超分辨成像 (图 23)。他们的结果显示, 可交换型的 Halo 蛋白和硅罗丹明配对体系因为漂白染料分子的可替代性, 具有显著延长的光稳定性。通过该体系, 他们实现了对细胞溶酶体, 磷脂, 内质网, 微丝蛋白, 细胞核和线粒体外膜的多色成像。

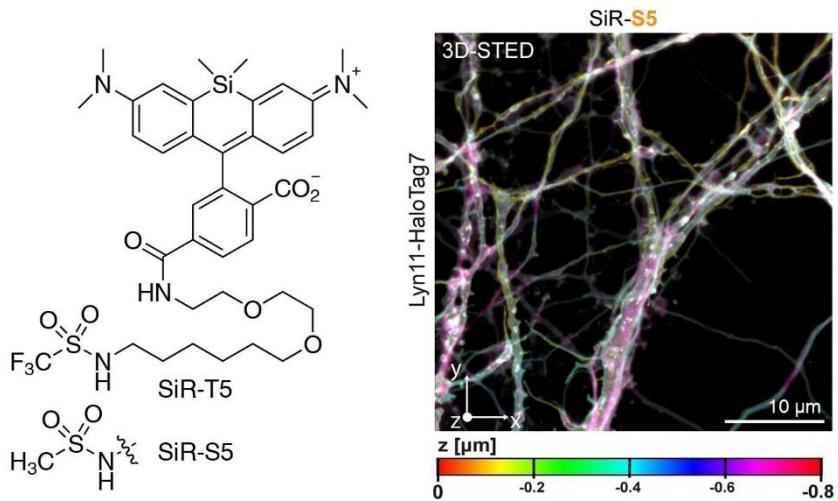


图 22. Hiblot 和 Johnsson 团队协作发展的可交换型适用于 Halo-tag 蛋白标签的
硅罗丹明^[92]

Fig 22. Exchangeable silicon rhodamine for Halo-tag labeling techniques. Developed by Hiblot and Johnsson groups^[92].

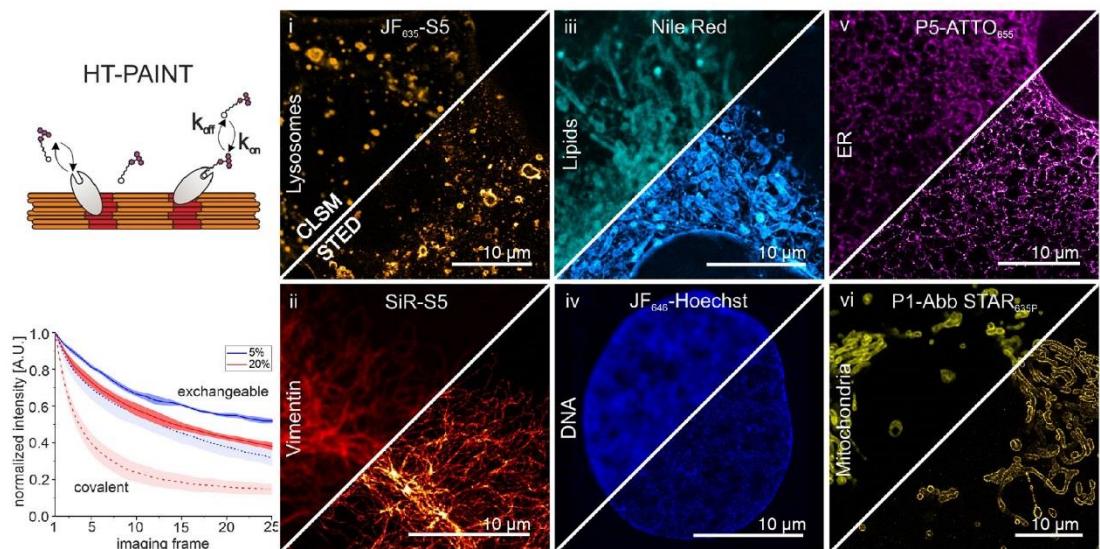


图 23. Glogger 和 Heilemann 团队利用可交换硅罗丹明实现多色 PAINT 超分辨率
成像^[90]

Fig 23. Exchangeable silicon rhodamine for multi-color PAINT super-resolution imaging. Performed by Glogger and Heilemann groups^[90].

与 Johnsson 团队几乎同时, Holtmannspötter 和 Piehler 团队^[93]共同协作对 Halo 蛋白也进行了突变研究。通过改变 Halo 蛋白氨基酸 Asn272 和 Leu273 成 His272 和 Tyr273, 他们设计了两种可以在共价

标记后,缓慢再解离的自标记 Halo 蛋白(reHaloTagS 和 reHaloTagF)。利用这种缓慢解离的过程,他们开发的 Halo 蛋白标签可对应底物多次标记,因而当染料发生漂白后,可利用解离和再标记过程恢复荧光,有利于长程 STED 超分辨成像。他们在线粒体 TOMM20 蛋白上验证了长程 STED 成像的特点(图 24),相较于传统的 Halo tag,他们发展的新 Halo 蛋白标签可以在再次成像时提供更好的成像信噪比。

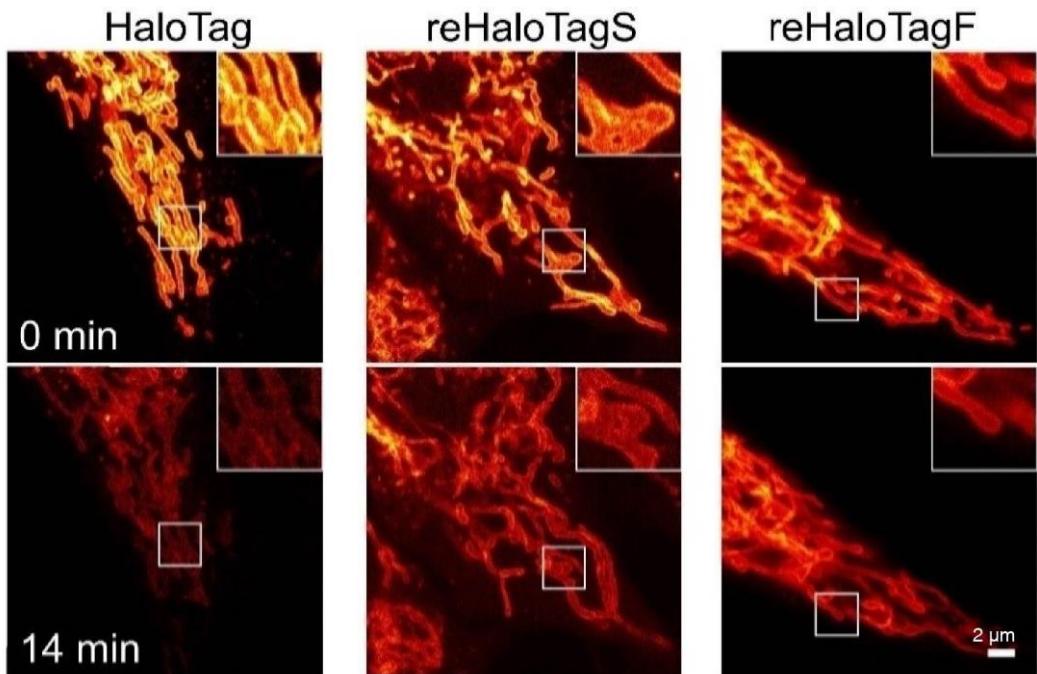


图 24. Glogger 和 Heilemann 团队利用可交换硅罗丹明实现多色 PAINT 超分辨成像^[93]

Fig 24. Exchangeable silicon rhodamine for multi-color PAINT super-resolution imaging. Performed by Glogger and Heilemann groups^[93].

另一方面, Johnsson 团队^[91]注意到 Halo 蛋白与染料尤其是罗丹明染料的强相互吸引力,这种作用力会改变罗丹明染料的荧光寿命。因此,他们通过定向改造 Halo 蛋白与罗丹明相互作用的特定氨基酸,发展了三种新的 Halo tag 蛋白(HT9, HT10 和 HT11)。其中 HT9, 改变原 Halo 蛋白 Gln165 至 His165, Pro174 至 Arg174; HT10, 改变原蛋白 Gln165 至 Trp165; HT11, 改变原蛋白 Met175 至 Trp165。加工后的 Halo 蛋白仍然可以对罗丹明染料底物进行自标记共价连接,然而由于改变了罗丹明染料周围蛋白界面环境,这些染料-突变 Halo

蛋白复合底物展现出与原染料、染料-Halo 蛋白截然不同的荧光寿命（图 25）。其中在 HT9 蛋白表面，大部分罗丹明类染料寿命均出现了延长；而在 HT10 和 HT11 上，这些染料荧光寿命则相对缩短。基于这种差异化的荧光寿命，作者提出可以在不改变荧光标记底物（即同一罗丹明底物），利用多种 Halo 蛋白表面的差异化荧光寿命，实现对不同靶标的多色成像。作者首次揭示了自标签蛋白的加工在拓展成像功能上的潜力。

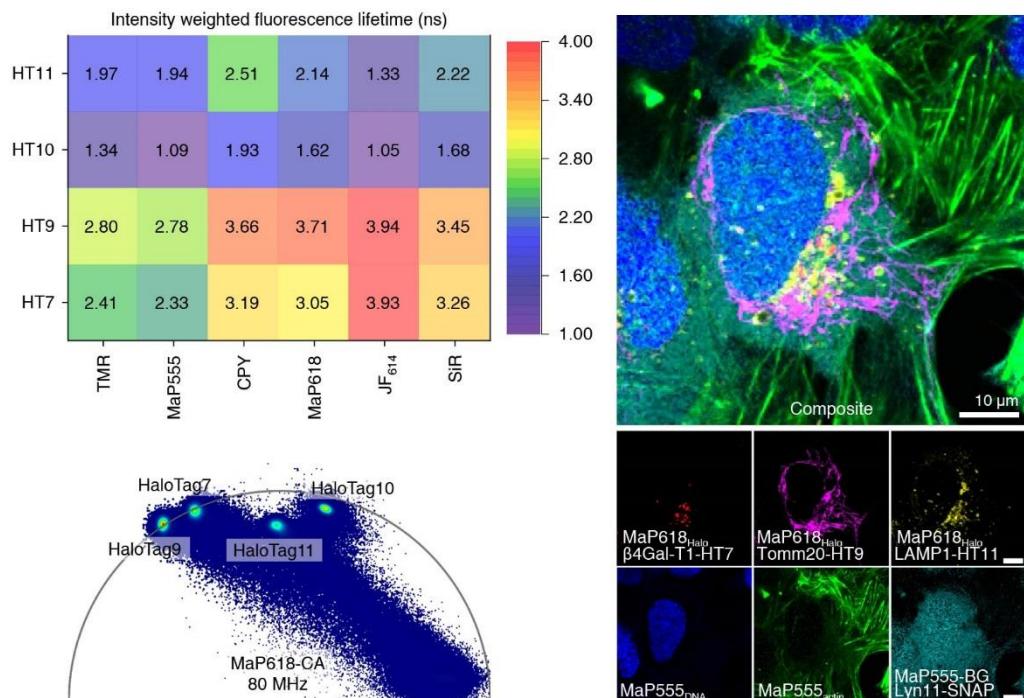


图 25. Johnsson 团队利用突变 Halo 蛋白实现荧光寿命多色拆分成像^[91]

Fig 25. Multiplexed fluorescent lifetime imaging through engineered Halo proteins.
Performed by Johnsson group^[91].

1.4.4 研究进展总结

超分辨成像技术的进步建立在现代荧光染料的进化基础上。自 2006 年单分子定位超分辨成像技术横空出世以来，超分辨成像及其荧光染料的开发已经走过了 16 个年头，但其热度依旧未减，亦反映出超分辨成像对于高性能荧光染料的迫切需求。包括诺贝尔奖获得者 Stefan Hell 以及 Kai Johnsson、Luke Lavis 等国际顶尖光学、生命科学和化学研究者依然孜孜不倦在超分辨成像荧光领域探索新染料的

设计,寻找更有效的成像工具。基于以上事实,超分辨成像荧光染料的设计开发需求仍然十分迫切,染料的进化将对超分辨成像光学显微镜在未来科学研究舞台的表现力产生深远影响。关于荧光染料的研究,是对科学研究基础工具箱的不断丰富,密切关联到全人类科学的研究的潜力。

1.5 本文解决的问题

为开发超分辨成像荧光染料,研究者使用了多样化的技术手段,包括染料母体结构设计、连接链优化和标记策略改良,然而一个被广泛忽视的事实是染料单分子尺度下荧光光物理性质。

传统染料的优化基于分子群体的光谱性质,然而在单分子尺度下,荧光染料展现出完全不同的光物理性质,其特征不同于整体连续性特征,而出现事件依赖性和随机性(例如,热力学上染料分子从暗态转换到亮态的平衡过程),单分子光物理性质与分子群体特征最典型的区别包括包括荧光亮度爆发性、间续存在的暗态、随机发生的光漂白过程。然而,对于超分辨成像及相关的纳米显微成像技术,观测对象已经由传统分子群体转向单个荧光染料,因而对于现代超分辨成像技术,需求具有单分子尺度高荧光功能特性的染料而非基于传统分子群体荧光优化的染料。为此,本文首先基于光路设计和算法开发对显微镜维度的拓展,确定染料现代荧光成像的问题;其次,融合本文作者博士期间开发的单分子光物理性质分析平台工具,以单分子光物理性质为锚定标准,对小分子有机荧光染料进行设计,发展超分辨成像现代染料。

2 拓展单分子定位超分辨成像显微镜的维度

2.1 前言—维度拓展的必要性

二维的信息维度限制了超分辨成像的分辨能力。从二维投影到三维重建，从单色单组分分辨到多色多组分关联分析，多样化信息赋予了研究者更强的微观解析能力和更接近真实世界的超分辨信息。更为重要的是，拓展超分辨成像的维度可提升标记染料荧光信息价值，延伸超分辨显微镜的应用空间。为此，需要对重点实验室现有的二维超分辨成像显微镜进行软硬件协同改造，以实现多维度的单分子定位成像。

二维向三维的迈进需要通过对显微镜的单分子点扩散函数（Point spread function, PSF）进行加工。2008年，Zhuang Xiaowei 团队^[95]发展了世界上第一台三维单分子定位显微镜，她们发展的策略是通过圆柱棱镜引入，将偏离焦面的单分子信号加工成有取向的点扩散函数；同年，Bewersdorf 团队^[96]通过将光路拆分成双通道，基于不同光路点扩散函数波前实现三维成像；2009年，Moerner 团队^[97]通过引入空间光调制器（spatial light modulator, SLM），将点扩散函数加工成双螺旋结构，实现轴向信息解析。这三种方法构成了最为经典的三维单分子定位策略，后续研究者在此基础上进一步通过 SLM 构建不同的三维点扩散函数^[98]，以深度网络建立轴向与 PSF 形态映射^[99]，或通过迭代自监督学习点扩散函数形貌^[100,101]，实现对 Z 轴信息的分析。

多色成像可通过多通道发射光路拆分实现，拆分后双通道数据的色差校正需要通过标定和对应算法实现。近年来，为避免色差校正过程，Kuner 团队为代表的研究者尝试通过序列成像方法^[102]避免色差效应，虽然这种方案有效的提升了多色成像的组分通量，但这种方式显著提升了成像的时间，不适用于活细胞等时间敏感样本成像；Schmoranzer 团队^[103]与 Xu ke 团队^[104]独立从光谱拆分角度，通过单通道信息采集，实现多色超分辨成像，但这种方法难以避免信号的串色扰动效应；Churchman 和 Spudich^[105,106]提出基于 Ardesir Goshtasby 的局域权重平均点校正算法^[107]，以正交多项式的基校正双色单分子定位超分辨成像色差。

基于实验室现有超分辨成像显微镜已经具有可双色拆分光路的情况，对于多色成像的拓展开发，应当解决色差校正问题；对于三维成像单分子点扩散函数改造，可通过引入不同焦距圆柱棱镜，利用散光效应形成与轴向位置映射的特定形貌单分子信号。

2.2 可识别轴向信息的点扩散函数构建

引入柱棱镜可以有效的对单分子点扩散函数进行修正，以获取单分子形貌反映的 z 轴位置信息。柱棱镜在 xy 方向上显示出不同的光束收缩效应，使得染料分子在焦面上或下显示出不同的单分子点扩散函数。如图 26a 所示，为重点实验室的超分辨成像显微镜光路，通过接力棱镜将荧光发射引入到 OptoSplit 分光系统中，图中所示为单色成像光路情况。基于该光路，可将柱棱镜引入如图 26b-e 所示四个位置，通过成像观察重建的光斑形貌，确定最优三维成像的插入位点。

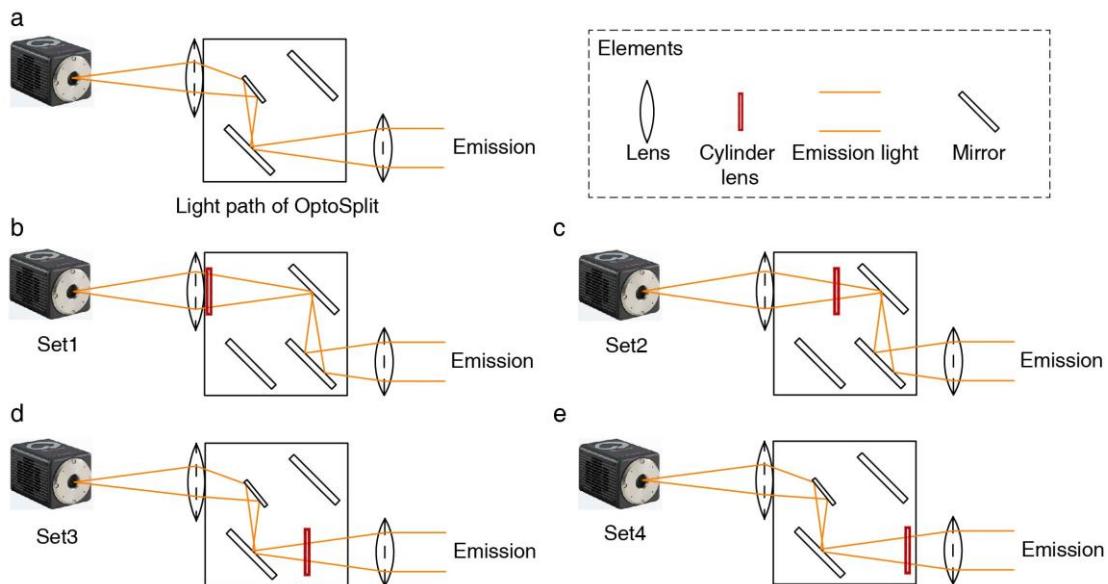


图 26. 引入柱棱镜修正发射光路实现三维超分辨成像

Fig 26. Engineered light path with a cylinder lens for three-dimensional super-resolution imaging.

图 27 展示了在四个设定位置引入相同的柱棱镜（焦距，Focus length/Fl = 1000 mm），对应的显微镜单分子点扩散函数的形貌特征。在所有位置引入柱棱镜，均可实现上下焦面差异化的单分子点扩散函数；当点光源（分子）所处焦面远离观察焦面时，点扩散函数会向单

一方向出现发散；柱棱镜在焦面 xy 的差异化散光效应，决定了离焦后扩散函数的发散方向。基于四个位置均可强化显微镜点扩散函数的轴向差异事实，可以初步推断设计四个位置均可引入柱棱镜来实现三维定位。然而，由于 OptoSplit 的可拆卸 Cube（分光镜组模块）的设计，Set4（图 26e）位置可轻松通过对系统外 Cube 的改造完成，易于实现三维/二维光路切换；其它位置（Set1-3），需要将分光系统 OptoSplit 顶部完全拆卸，切换操作十分复杂，带来实际应用挑战性。基于上述事实，柱棱镜引入位点确定为 Set4，并在此进行后续的优化。

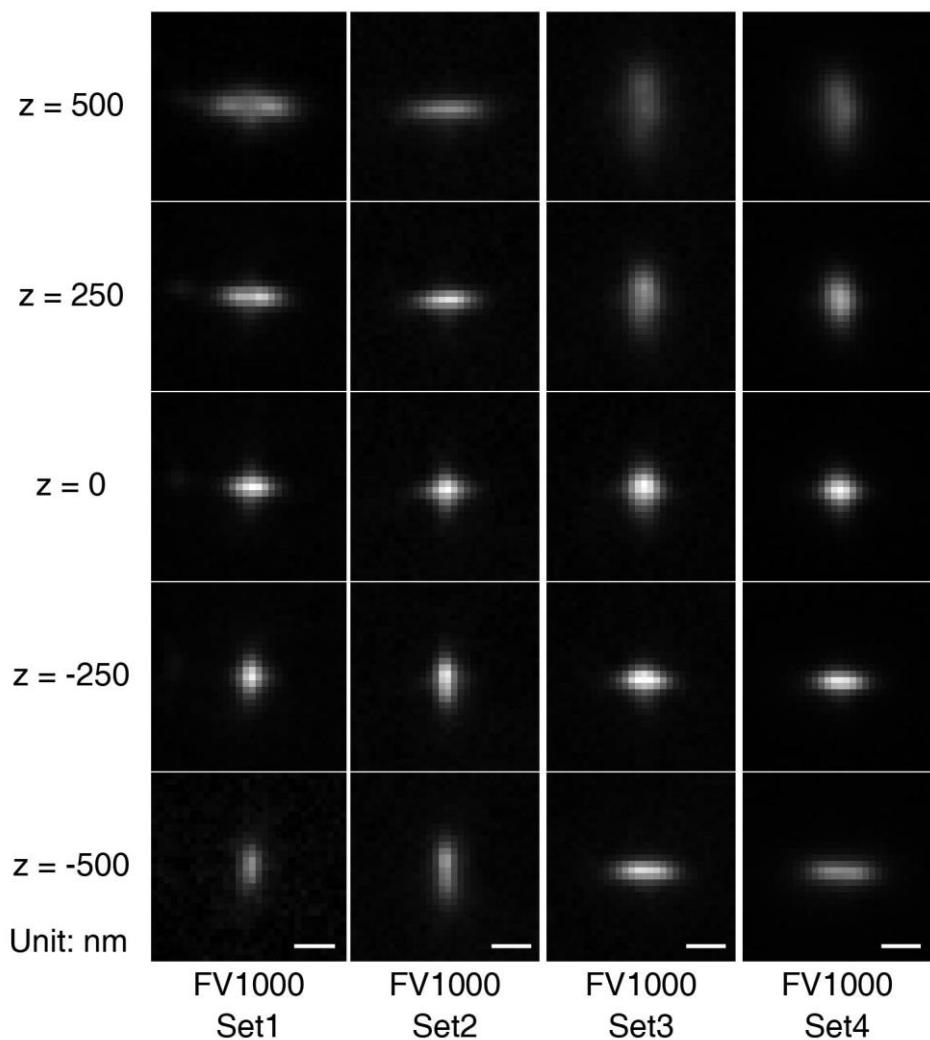


图 27. 不同位置引入焦距 1000 柱棱镜构造的单分子点扩散函数
Fig 27. Point spread functions from different optical sets. Scale bar: 1 μ m

基于 Set4 引入位置, 下面对柱棱镜的焦距进行了优化尝试。图 28 展示了引入不同焦距 ($FV = 1000, 1554.42, 3886.05 \text{ mm}$) 柱棱镜后, 显微镜的点扩散函数形貌。图中可见, 当引入柱棱镜的散光焦距过大, 点扩散函数明显光斑凝聚性更好, 但焦面上下差异性消失; 而当引入焦距相对小的柱棱镜时, 散光效应增强, 单分子点扩散函数在离焦后, 其整体形态迅速扩大, 变得几乎不可分辨。在 $FV = 1554.42$ 柱棱镜下, 显微镜的点扩散函数显示出同时保持形貌尺寸较小(集中), 同时在焦面上下显示出较大差异性, 因而是较优选择。

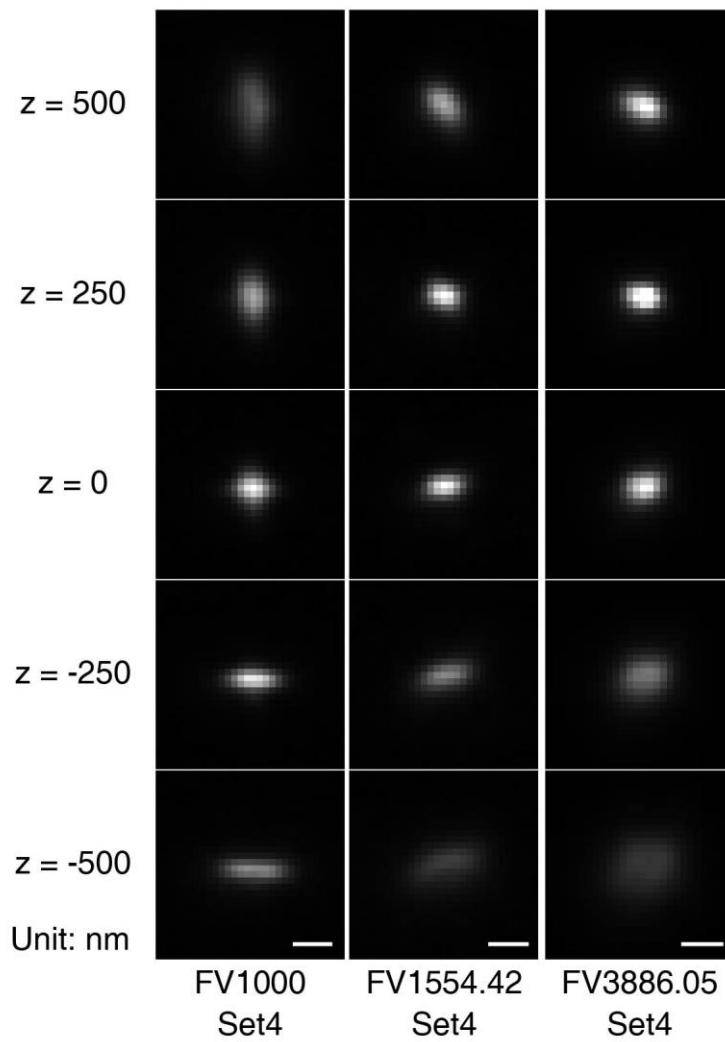


图 28. 不同焦距柱棱镜构造的单分子点扩散函数

Fig 28. Point spread functions with cylinder lens of different focus length. Scale bar: 1 μm

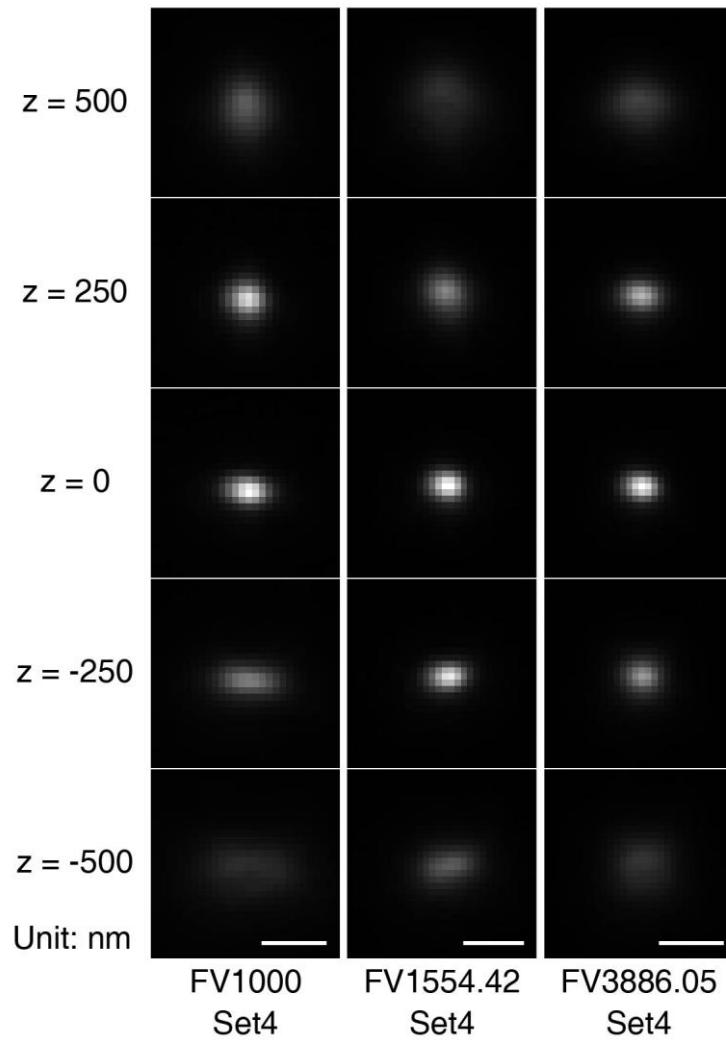


图 29. 放大镜切入后的三维成像单分子点扩散函数

Fig 29. Point spread functions at magnified configuration. Scale bar: 1 μm

为了确定柱棱镜选择,下面进一步比较了在切入显微镜发射光路的放大镜后显微镜点扩散函数的差异性。显微镜发射光路的放大镜切入后,可以增大点扩散函数的采样像素数量,从而更精确的拟合单分子光斑形态。图 29 展示了在引入放大镜后,三种不同焦距柱棱镜构建的显微镜点扩散函数形貌。 $\text{Fl} = 3886.05$ 柱棱镜构建的点扩散函数在该条件下几乎丧失了离焦后的形貌特异性,不适用于三维定位分析; $\text{Fl} = 1554.42$ 与 1000 焦距柱棱镜构造的点扩散函数保持有较大的离焦差异性。但 $\text{Fl} = 1000$ 柱棱镜构造函数在离焦面-500 nm 和 500 nm 处显示处光斑显著的发散,不利于成像定位。相对而言, $\text{Fl} = 1554.42$

柱棱镜条件下,发射光路仅在500 nm处发散,在三种焦距柱棱镜中展现出最凝聚的函数构造特征。为此, $F_1 = 1554.42$ 最终被引入显微镜,以构建适用于三维定位的单分子点扩散函数。

在柱棱镜引入位置和焦距确认后,进一步在空间上调整了柱棱镜的散光取向,使得离焦点扩散函数的散光方向于相机像素的x、y轴尽可能重合。图30展示了优化后的显微镜单分子点扩散函数的三维重构结果。新点扩散函数的光斑尺寸较小,使得光子信号集中,提升了成像的单分子信号信噪比;同时,新点扩散函数仍然表现出扩张方向相异的离焦波前特征,可以实现对三维位置的定位分析。

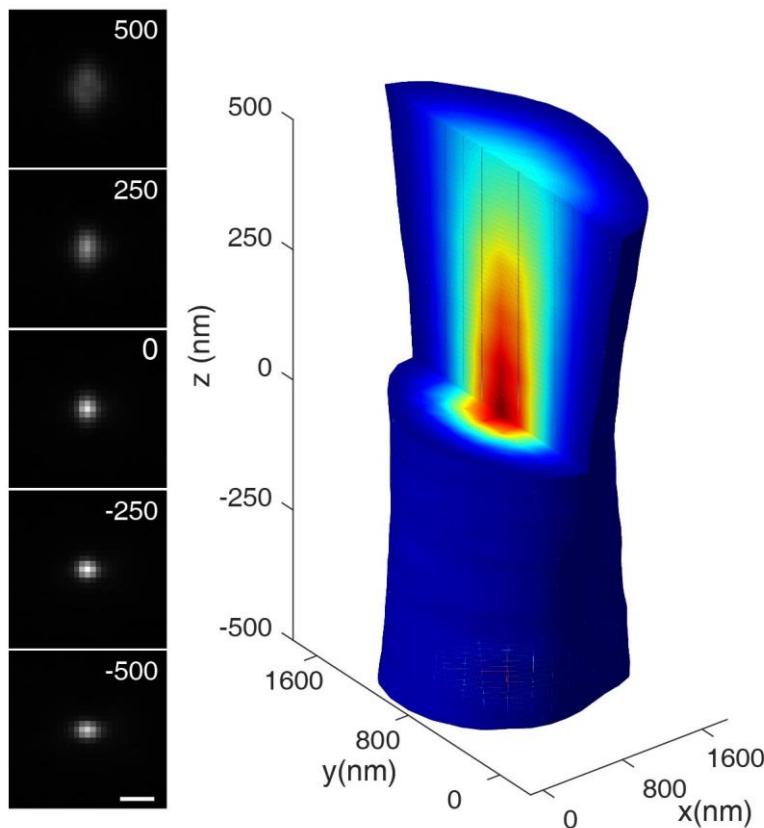


图30. 优化的单分子点扩散函数用于三维定位超分辨成像

Fig 30. Optimized single-molecule point spread function for three-dimensional localization super-resolution imaging. Scale bar: 1 μm

由于单轴散光后的点扩散函数出现了二维椭圆高斯函数特征,可尝试用二维椭圆高斯函数对信号进行拟合,通过高斯函数不同轴的标

准方差对比差异，确定分子所在 z 位置。方程 (1-3) 描述了这种二维椭圆高斯函数在像素上积分形式：

$$\text{PSF}(x, y) = N E(x) E(y) + b \quad (1)$$

$$E(x) = \frac{1}{2} \left(\text{erf} \left(\frac{x-x_0+0.5}{\sqrt{2}\sigma_x} \right) - \text{erf} \left(\frac{x-x_0-0.5}{\sqrt{2}\sigma_x} \right) \right) \quad (2)$$

$$E(y) = \frac{1}{2} \left(\text{erf} \left(\frac{y-y_0+0.5}{\sqrt{2}\sigma_y} \right) - \text{erf} \left(\frac{y-y_0-0.5}{\sqrt{2}\sigma_y} \right) \right) \quad (3)$$

其中， x, y 是任意像素坐标， x_0, y_0 是定位的分子中心， N 是分子发出总光子数， σ_x, σ_y 是二维高斯函数在不同轴的标准方差， $\text{erf}()$ 是误差函数， b 为背景噪音。

基于最大似然方法拟合后，可以对不同焦面点扩散函数的 x, y 轴标准方差进行分析，确定优化后单分子信号具备有离焦相异性。图 31 的蓝色线显示了实验数据 x, y 轴标准方差 σ_x, σ_y 随 z 深度变化趋势。图中显示出在 $z=0 \text{ nm}$ 深度两侧， σ_x, σ_y 随着深度增加或减少出现不同增大倾向。在较高 z 位置 ($z=0 - 400 \text{ nm}$)， σ_y 相比于 σ_x 显示出增加速度更快；而在较低 z 位置 ($z=0 - -400 \text{ nm}$)， σ_x 显示出更快的变大倾向。

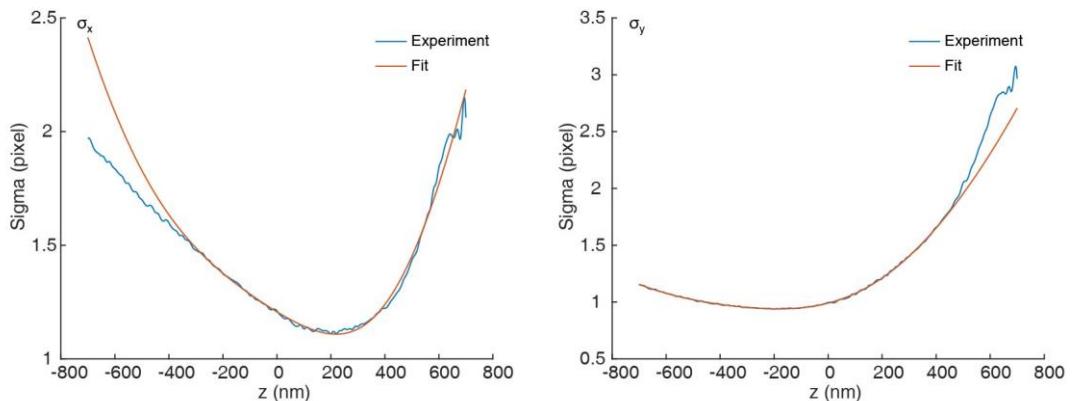


图 31. 优化后点扩散函数的 x, y 轴标准方差 σ_x, σ_y 随 z 深度变化曲线

Fig 31. Plot of σ_x, σ_y vs z depth for optimized point spread function

根据 Zhuang Xiaowei 等学者描述，这种 σ_x, σ_y 与二维椭圆高斯函数整体标准方差 σ_x (或 σ_y) 可用下方程 (4) 描述：

$$\sigma_x(z) = \sigma_0 \sqrt{1 + \frac{(z-\gamma)^2}{d^2} + A \frac{(z-\gamma)^3}{d^2} + B \frac{(z-\gamma)^4}{d^2}} \quad (4)$$

其中, σ_0 为点扩散函数在焦标准方差; γ 为点扩散函数相对在焦面的 z 轴位置; d 、 A 、 B 为对应的系数。图 31 的红色线展示了通过这个方程拟合的对应 σ_x 和 σ_y 随深度变化曲线, 可以看出拟合结果很好覆盖了 $z = -500 - 500 \text{ nm}$ 标准方差变化趋势。

然而椭圆二维高斯函数作为三维单分子点扩散函数拟合形式具有天然的缺陷, 它仅能够针对沿 x 、 y 轴散光的标准函数。在实际光路搭建中, 柱棱镜散光难以完美的对齐坐标轴, 造成偏差, 因而不能适用于通用椭圆二维高斯函数。如果考虑这种对齐误差, 将极坐标引入校正函数, 则会造成椭圆高斯函数形式复杂化, 导数形式难以获得, 不能实现似然化求解过程。另外一种通过旋转获取信号的方法, 可以获得与 x 、 y 轴对齐单分子点扩散函数, 但是这种方法因实际相机的像素化过程, 在旋转计算过程中产生信号失真, 使得最终的定位解析精确度显著下降。

考虑到以上因素, 为精确获取单分子信号的形态学信息, 可以使用三次样条 (cubic spline) 方法构建模型单分子点扩散函数^[28,108]。三维定位中使用的三次样条函数方程 (5) 如下所示:

$$f(x, y, z) = \sum_{p=1}^4 \sum_{q=1}^4 \sum_{r=1}^4 a_{p,q,r} \left(\frac{x-x_0}{d_x}\right)^{p-1} \left(\frac{y-y_0}{d_y}\right)^{q-1} \left(\frac{z-z_0}{d_z}\right)^{r-1} + b \quad (5)$$

其中, x 、 y 、 z 为坐标, $f(x, y, z)$ 为该空间点上 PSF 的强度 (光子数), x_0 、 y_0 、 z_0 为分子信号的中心位置, d_x 、 d_y 、 d_z 为归一化参数, $a_{p,q,r}$ 为系数。由于三次样条函数的构建需要 64 个系数, 每个像素在空间构成单元体素 (unit voxel) 的边界条件不足, 为此, 需要对成像采样数据进行 spline 插值 (在每个轴插值 3 次)。通过插值后获取的数据, 求解模型单分子点扩散函数的三次样条系数。

成像实验数据即可通过最大似然法求解, 基于模型单分子点扩散函数计算光子抵达的概率模型。在实验中, 像素 i 收集到 N_i 光子的可能性为

$$P(N_i | f_i) = \frac{f_i^N}{N_i!} e^{-f_i} \quad (6)$$

f_i 为标准模型单分子点扩散函数的三次样条函数。通过寻找合适的参数 θ (x_0 、 y_0 、 z_0 、 N), 最小化损失函数 (7) 即可分析出实验样

品分子的空间位置和发出光子信息。

$$\mathcal{L}(\theta|f) = \prod_i P(N_i|f_i) \quad (7)$$

为分析三维算法的精确度，在将柱棱镜按照 Set4 插入光路后，对荧光珠进行了超分辨成像。成像利用纳米压电载物台实现 10 nm 的样品位移，从而在观察荧光珠处于不同焦面位置的成像结果。通过成像前建立的显微镜模型单分子三次样条函数模型，实现对荧光珠的轴向位置分析。分析结果与荧光珠对应实际轴向位移参照，确定算法三维定位的实际精度。图 32 展示了从 -500 – 500 nm 焦面深度下，算法轴向定位精确度。在 -150 – 350 nm 区间内，算法展现出较好的定位精度，其误差小于 50 nm；而在 -100 – 100 nm 的 z 焦面区间内，算法的轴向精度更达到 18.1 ± 5.0 nm。这些结果显示出柱棱镜引入的光路设计和三次样条函数算法的协同开发，可以实现精确的三维超分辨成像。

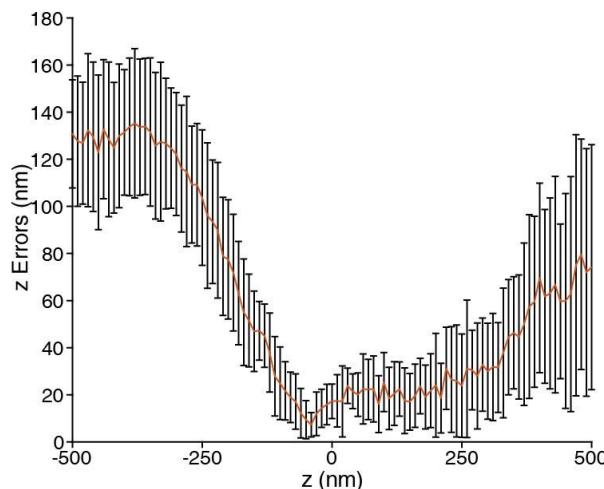


图 32. 实验测量的轴向定位偏差随 z 深度变化曲线

Fig 32. Experimental plot of z localization errors vs z depth.

上述三维单分子定位分析方法可以拓展到任意的点扩散函数中。基于显微镜非理想化的不对称性，未加入柱棱镜的光路也可以产生焦面上下不对称的单分子点扩散函数，利用这种微弱的非对称性，三次样条方法仍然可以实现三维单分子定位^[28]。基于该认知，在未加入棱镜条件下，用荧光珠标记获取非理想化的单分子点扩散函数，然后用这个模型的三次样条函数去拟合在同样光路条件下收集的固定细胞微管单分子数据，成像的三维重构结果可参见图 33。

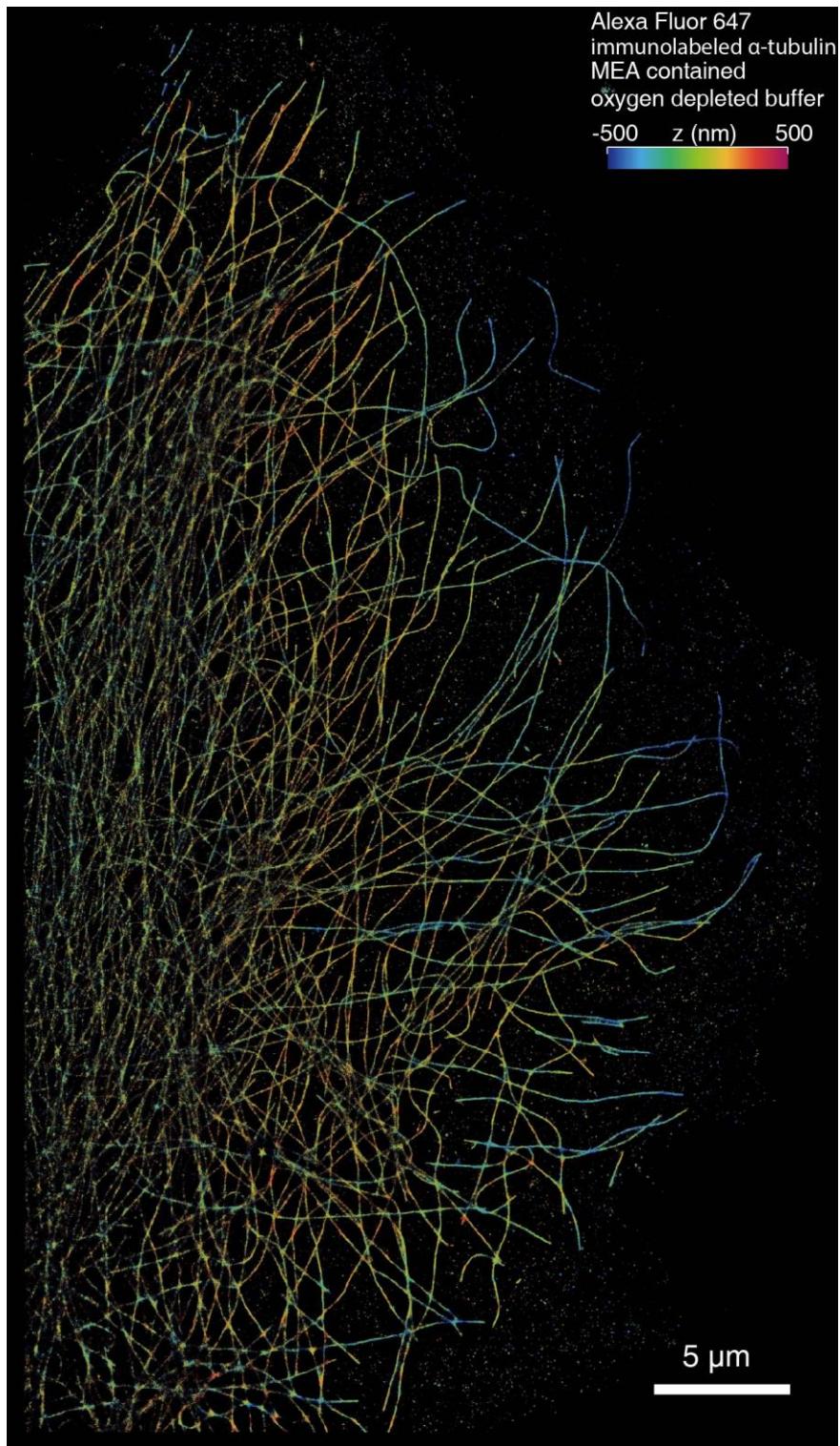


图 33. 三维固定细胞微管超分辨成像

Fig 33. Three-dimensional super-resolution imaging of tubulins in a fixed HeLa cell.

图中颜色标记了定位分子的 z 轴位置, 可以看出随着微管逐渐衍生到细胞膜边界, 其所处的 z 轴深度也不断增加; 而细胞内的微管则处于较高的 z 轴位置。三维微管超分辨成像结果证实了三次样条算法完成三维单分子定位的有效性。引入柱棱镜的三维超分辨成像可参见节 4.5 对红细胞膜的三维成像结果。

2.3 双色超分辨成像色差校正

双色单分子定位超分辨成像存在色差, 影响了双色成像的准确性 (示意结果如图 34)。虽然通过 OptoSplit 拆分光路, 在相机上可同时收集不同波长信号, 但由于光路非理想化不对称性以及波长影响的差异化折光效应, 同一相机上收集双色信号存在色差。由于双色的波前难以实现完全协调一致, 这种色差在视野场内表现出不均匀性: 在靠近图像上端部分, 可能在 x 轴上偏差较大; 在图像下端部分, 可能在 y 轴上出现更大的偏差。对于精确度更高 (甚至单分子尺度) 的超分辨成像而言, 这种不均匀性 ($\leq 2 \mu\text{m}$) 更为成像带来极大的困扰, 严重干扰了成像的精确度。

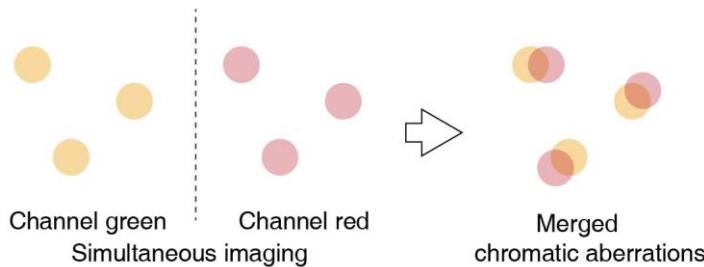


图 34. 同时双色超分辨成像的色差

Fig 34. Chromic aberrations induced by simultaneous two-color super-resolution imaging.

为解决这个问题, 本文提出利用荧光珠对视野进行色差采样校准, 而通过自然邻近插值算法解决荧光珠采样的频率问题。图 35 以示意图方式展示了自然邻近插值算法解决多色成像色差的步骤: 1, 通过测量双通道荧光珠的点扩散函数, 测量在荧光珠像素位置的色散效应; 2, 多组荧光珠在不同位置测量结果显示整个视野场不均匀的色散差异性; 3, 基于 Delaunay 三角剖分方法, 建立离散荧光珠位置的 Voronoi 图; 4, 插入新点建立新的 Voronoi 单元, 利用自然邻近插值

算法以新单元在原单元分布的面积占比，计算新点的色差；5，计算整个视野各个位置的色差；6，利用计算完成的色差校准双色成像图。其中，Delaunay 三角剖分与 Voronoi 图为同一剖分方法的不同展示方式，因而在获得荧光珠标记位置的 Delaunay 三角剖分图后，很容易转换成对应的 Voronoi 图。

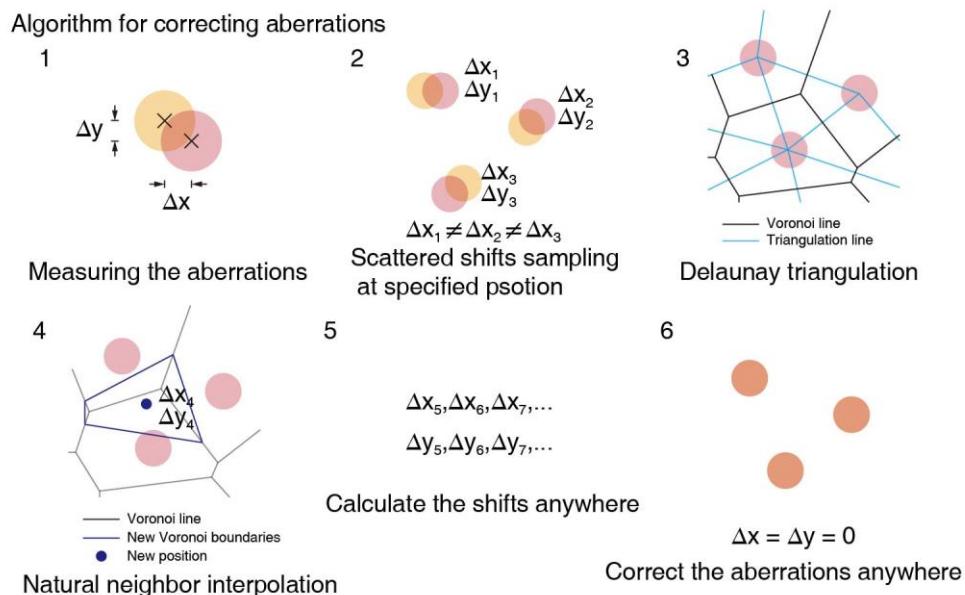


图 35. 自然邻近插值算法解决多色成像的色差

Fig 35. Correction of chromatic aberrations by natural neighbor interpolation algorithm.

荧光珠由于内含有多组分的染料，可同时被 532 nm 和 640 nm 激光激发出双色波长的发射，这些信号可在双通道分别收集；荧光珠的小尺寸（100 nm）使得它可在远场显微镜系统下近似为发光点，因而其信号可被视作显微镜的点扩散函数。利用这两个前提条件，利用在盖玻片上散落附着的荧光珠，可对显微镜的色差进行校正。

然而，为了避免相互交叠，荧光珠在视野场内稀疏分布，使得对全视野场的完全采样变得极为困难。如果假定在光的色差在视野场具有连续性特征，可通过插值方式，取得全视野的色差。然而，在不具有 xy 高精度纳米位移台显微镜上，荧光珠分布特征难以建立空间规整性，一般的 Spline 插值方法实施困难。

解决这个问题可通过自然邻近插值方法，以 Sibson 方法计算权

重而解决（图 36）。以荧光珠标定位置为基准建立 Voronoi 图 $V_1 = \{v_1, v_1 \in FOV\}$ (v 为对应 Voronoi 节点, FOV 代表 Field of view, 视野场; 图 36a), 然后将需要计算色散的新点 (p) 引入到基准点图中建立第二张的 Voronoi 图 $V_2 = \{v_2, v_2 \in FOV\}$; 通过 V_1 与 V_2 的交叠 (图 36b), 找到由新形成 Voronoi 节点 (v_2' , 空心红色圈) 构成对应插入点的 Voronoi 单元 V_2' ; 这个单元被原 V_1 给分割成多组多边形 (图中不同灰度多边形), 而每组多边形的面积占据整体单元的 V_2' 面积之比, 确定新插入 p 点的色差受已知标定位置色差影响的权重 w (见方程 8)。

$$w_i = \frac{S_i}{\sum_{i \in V_2'} S_i} \quad (8)$$

其中, S_i 为对应分割后形成多边形的面积, w_i 对应已标定位置影响 p 点权重。

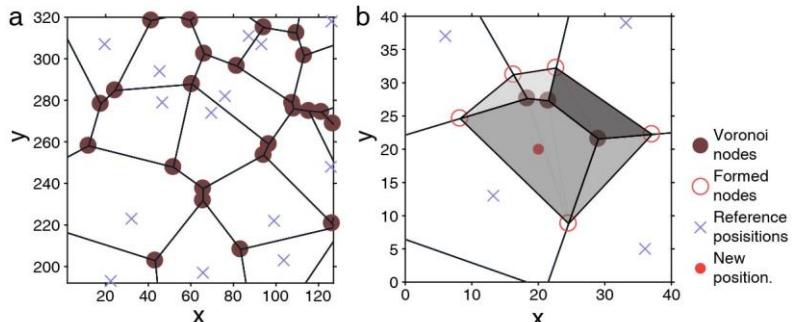


图 36. 通过荧光珠标定实验完成的自然插值计算过程

Fig 36. Natural neighbor interpolation through experimental beads sampling.
(a) Voronoi diagram of beads positions. (b) New Voronoi cell formed by Interpolation of a new position

基于上述插值方法, 可对整个视野场的色差进行校正分析, 实验显微镜的色差矢量图可见图 37。图中显示出相对于短波通道 (540-630 nm), 长波通道 (650-750 nm) 整体呈现出- Δ shift (700 nm - 1 μ m) 的色差。在靠近坐标轴原点的局部, 色差较小; 在视野场右侧 ($x = 150-250$, $y = 50-150$; 单位为像素), 呈现出较大视野场位移 (Δ shift 可达到 1 μ m)。结果显示光场不均匀性以及通过自然邻近插值算法校正双色成像色差的必要性。

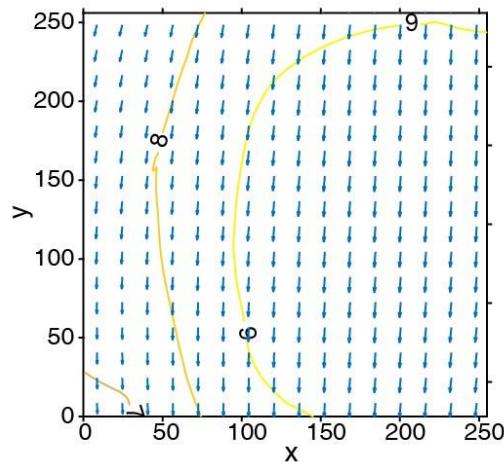


图 37. 重点实验室超分辨成像显微镜的色差矢量分布图

Fig 37. Vector field plot of chromatic aberrations for the super-resolution imaging microscopy in the key laboratory.

Counter lines plot the absolute aberrations. Unit is pixel.

为分析校正的实际精确度, 使用邻近插值算法对荧光珠双色成像结果进行了校正。如果假设荧光珠中染料分布均匀, 那么可以推定荧光珠的双色成像质心应当重叠, 因而对荧光珠双色成像后质心的距离可标定双色校正算法精确度。图 38a 展示校正后, 典型的荧光珠双通道定位结果, 双色定位中心位置接近。对多组视野不同位置荧光珠校正分析, 计算出校准平均精度可达 7.4 ± 5.6 nm, 显出新算法的高精确性。

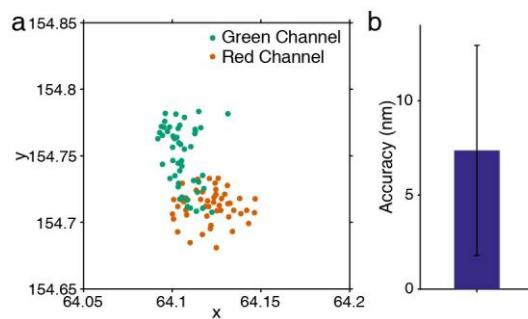


图 38. 自然邻近插值算法的实际校正精度

Fig 38. Experimental correction accuracy of natural neighbor interpolation algorithm.

(a) Typical plot of corrected localizations on two channels from a bead. (b) Correction accuracy calculated from $n = 8$ bead signals.

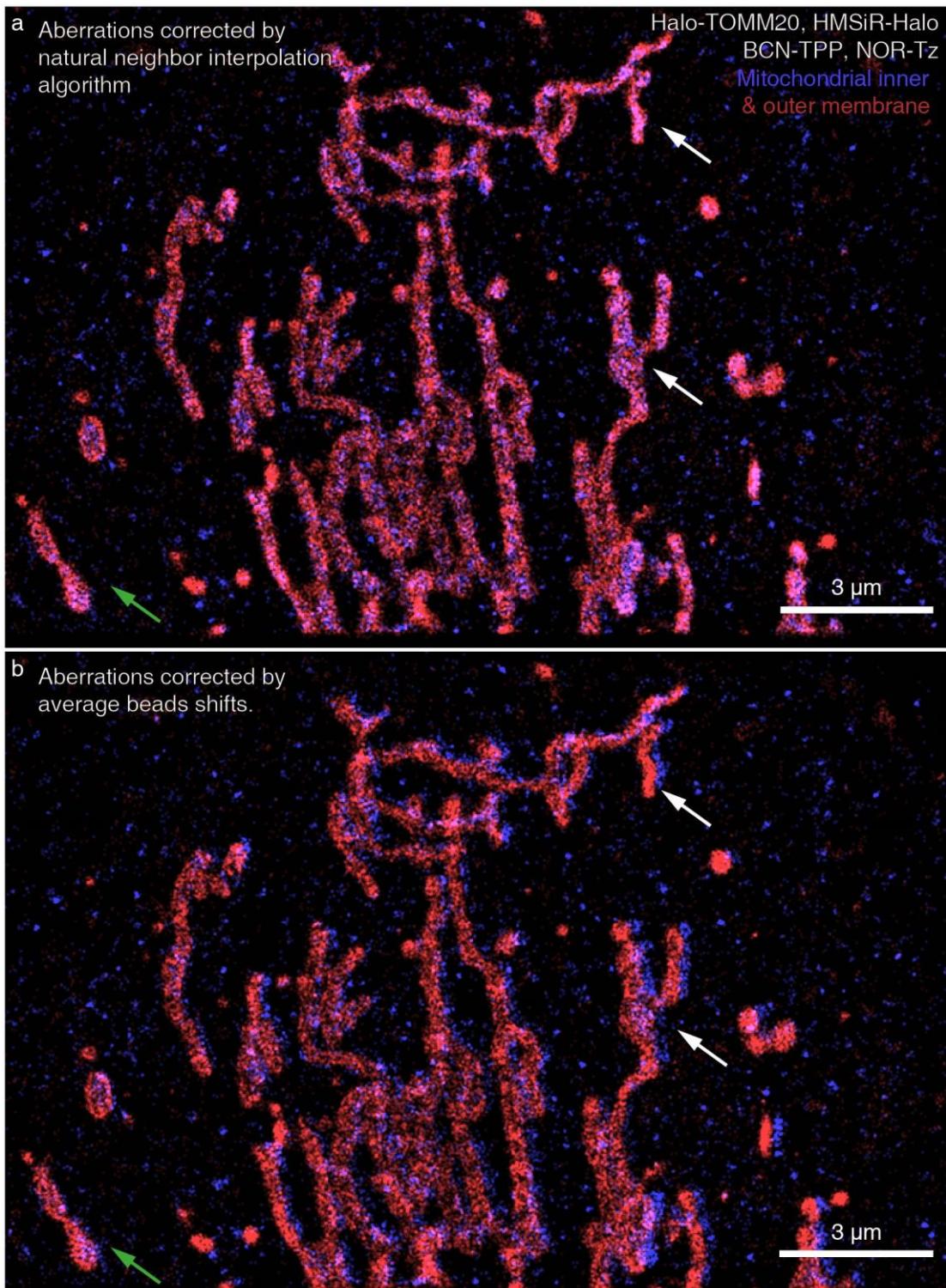


图 39. 双色超分辨成像线粒体内外膜揭示自然插值算法必要性

Fig 39. Two-color super-resolution imaging of mitochondrial inner and outer membrane, revealing the significance of natural neighbor interpolation algorithm

通过自然邻近插值算法的实践,实现了对线粒体内外膜双色超分辨成像。图 39a 展示了线粒体内外膜双色超分辨成像结果,成像清晰的展示了蜿蜒的线粒体形态,并揭示了线粒体外膜与内膜的空间关系。将通过自然邻近插值算法校正色差的双色重构,与通过平均荧光珠平均偏差校正的重构结果(图 39b)对比,可见新算法的精确色差校准能力。虽然对于部分线粒体(绿色箭头),新旧算法重构的线粒体外膜包覆完全内膜。但对于大部分的线粒体(白色箭头),传统荧光珠平均偏差校正算法则出现了线粒体内膜因不精确色差校正离开外膜包覆区域的情况。成像结果清晰展示了新自然邻近插值算法对于校正色差的精确性。

2.4 总结

算法开发与光路调节融合实现了对超分辨成像显微镜维度拓展。通过引入可切换的柱棱镜,改造显微镜的点扩散函数,实现 z 轴非对称性;通过 Cubic spline 算法,计算模型单分子点扩散函数,并对实验单分子信号应用最大似然法拟合,重建样品三维结构(轴向精度可达到 18.1 ± 5.0 nm);基于自然邻近插值算法,精确测量全视野的色差,实现双色超分辨成像的精确校正(色差校准精度可达到 7.4 ± 5.6 nm)。

3 酸性解离常数 (pK_a) 定义自闪烁?

3.1 前言—自闪烁罗丹明染料发展历史

在一篇标杆性的研究论文中^[109], Urano 团队揭示了使用罗丹明螺内酰亚胺的螺环化热力学平衡作为单分子定位荧光稀疏性来源的可能性。在这篇工作中, 他们基于螺环位置取代基亲核效应调控, 发展了第一代的自闪烁硅罗丹明染料 (HMSiR)。他们提出: 基于这个染料小于等于 6 的 pK_a (即 $pK_{cycling}$), 该染料在成像的中性生理环境中 ($pH = \sim 7$) 大部分分子处于暗态, 从而提供稀疏的荧光信号满足单分子定位成像。因此, 在无成像液和紫外光激发条件下, 他们利用 HMSiR 实现了对活细胞微管的超分辨成像。这篇论文中, Urano 首次开发了自闪烁硅罗丹明染料, 并展示了其强大超分辨成像潜力, 为染料研究工作者开辟了一条新的道路。

此后, 在寻求罗丹明染料标记的荧光增强效应时, Hell、Lavis 和 Johnsson 等团队提出了利用罗丹明热力学平衡过程实现免洗成像的可能性^[68,75,110]。他们基于罗丹明螺环化热力学平衡在不同介电常数溶剂中分布特征, 提出 D_{50} 和 K_{L-Z} 作为表征螺环化热力学平衡对环境响应特征物理参数, 并发展了一系列的在蛋白界面上 (尤其 Halo 蛋白表面) 标记后形成荧光增强的免洗罗丹明染料。通过调节罗丹明螺环处于暗态 (暗示了一个较小的 pK_a), Lavis 团队^[110]以及 Wang Lu 和 Kai Johnsson 团队^[67]独自发展了 Janelia flour 526 和 Map 系列自闪烁染料。

近年来, 自闪烁染料的开发逐渐变得火热。Urano 团队^[111,112]和 Schepartz 团队^[70]基于 $pK_a \leq 6$ 定义发展了发射波长调节的自闪烁罗丹明染料。同时, 许多染料研究工作者包括本人所在课题组也应用 $pK_a \leq 6$ 作为预测自闪烁性质的基准^[113-115]。在两篇基础研究工作中, Liu 和 Xu 团队^[116]基于计算化学评估了热力学平衡常数, 并且建议使用 5.3–6.0 的 pK_a 窗口作为自闪烁标准, 同时还提出设计自闪烁罗丹明的开关环 Gibbs 自由能差应当在 1.156–1.248 eV 之间。

在众多的自闪烁罗丹明染料发展背后, 研究者似乎已经将 $pK_a = 5 - 6$ 作为自闪烁标准。然而, 在实验中经常发现: 某些罗丹明染料即便满足这种自闪烁基准, 它们仍然难以在无外加激活光条件下完成

超分辨成像。这说明 pK_a 并不是自闪烁的合理基准。

3.2 面向自闪烁机制探索罗丹明染料设计

在博士研究期间,本人及合作者层发展甘氨酸罗丹明 Rh-Gly^[117], 这种染料具有 5.35 的 pK_a , 满足过去认知的自闪烁标准。然而, 在超分辨成像中, Rh-Gly 的单分子信号在不利用激活光条件下难以继, 显而易见的不具备持续性特征, 因而难以完成成像重构。这些结果说明 pK_a 作为热力学稳态参数并不能够反映自闪烁过程从暗态开环到亮态的动力学特点, 需要重新对自闪烁罗丹明染料进行审视和单分子尺度光物理性质研究, 寻找真正表征自闪烁过程染料分子特色的物理性质 (图 40a)。

为此,在本节发展了一系列具有不同热力学平衡常数的罗丹明染料 (图 40b)。其中, 两种传统染料 Rh-Gly ($pK_a = 5.35$)、HMSiR ($pK_a = 5.67$) 具有满足小于 6 的 pK_a , 可用作对比染料。Rh-Gly 展现出区别于自闪烁罗丹明的成像性能, 而 HMSiR 是先驱的自闪烁罗丹明模型染料。同时, 四种不同供体胺基的磺酰胺罗丹明被设计和合成, 包括 STMR (四甲基, $pK_a = 7.18$)、SRhB (四乙基, $pK_a = 6.91$)、PySRh (吡咯烷基, $pK_a = 7.34$) 和 PiSRh (六氢吡啶基, $pK_a = 5.05$)。这四种磺酰胺罗丹明受胺基的供电子效应影响, 具有不同的螺环化热力学平衡常数 pK_a 。同时受到 Halo 蛋白界面对罗丹明染料双离子亮态亲和力影响, 这些染在在标记到 Halo 蛋白后更容易开环, 具有比溶液 pK_a 更大的 pK_a' 。

磺酰胺罗丹明 (Sulfonamide rhodamines) 的吸收和荧光光谱随着供体胺基的供电子效应增强而出现红移 ($\lambda_{ab} = 561-573$; $\lambda_{em} = 580-596$; 单位: nm), 这一系列染料均展现出较好的亮度特征 ($\varepsilon \times \Phi = 3.1$, STMR; 2.7, SRhB; 6.2, PySRh; 2.3, PiSRh; 单位: $\times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, 乙醇中), 满足于超高分辨成像的需求。关于磺酸罗丹明染料的光谱及热力学常数细节探讨及结果可参见郑莹博士论文。

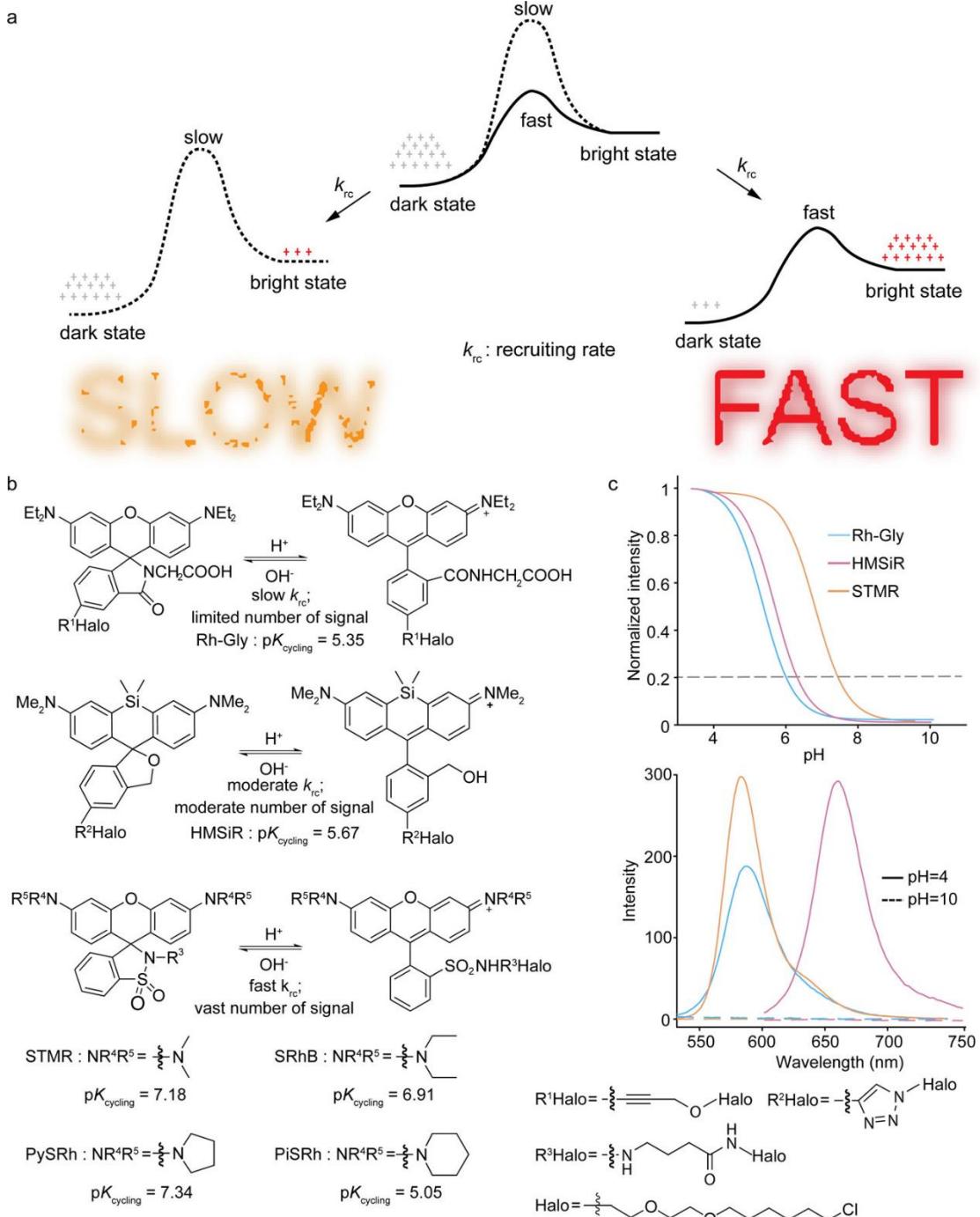


图 40. 罗丹明螺环化热力学平衡影响超分辨成像示意图

Fig 40. Schematic illustration of equilibrium kinetics on the super-resolution reconstruction.

(a) The effect of the recruiting rate of fluorophores in SMLM imaging. (b) Spontaneous spirocyclization equilibrium of rhodamine. (c) Integrated emission intensity vs pH of STMR, Rh-Gly, and HMSiR in PBS(phosphate-buffered

saline)/C₂H₅OH (v/v = 7:3) and the spectral comparison in acidic and basic conditions.

3.3 分子群体水平上螺环化动力学研究

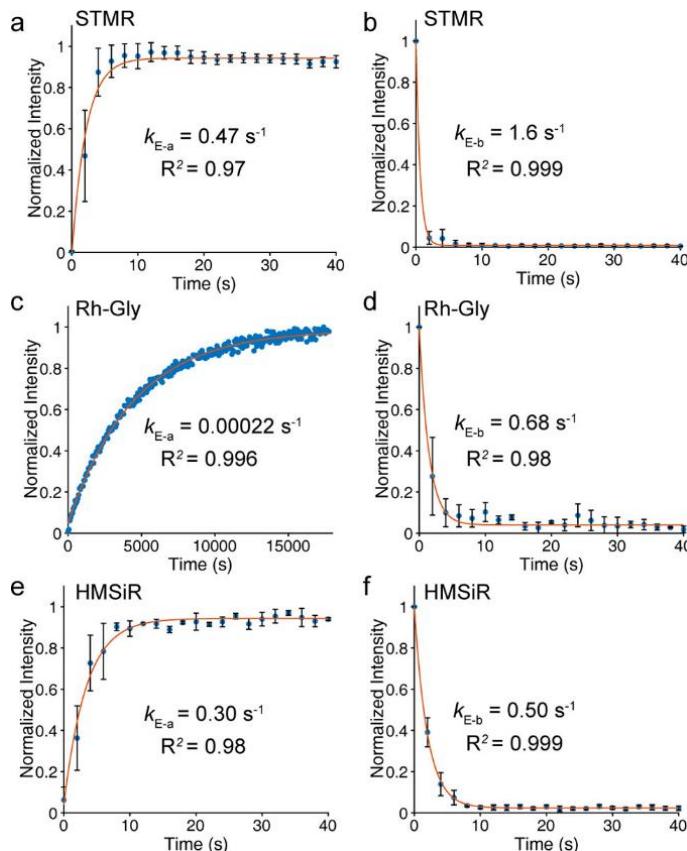


图 41. STMR、Rh-Gly 和 HMSiR 的基于分子群体水平螺环化动力学平衡动力学研究。

Fig 41. Ensemble kinetic study of spirocyclization equilibrium for STMR, Rh-Gly, and HMSiR bonded to Halo proteins after acid or basic perturbation.

Peak emission intensities (582, 589, and 668 nm) are plotted as a function of time, showing the rates reflecting equilibrium shifts to ring-opening (k_{E-a} , a, c, and e) and ring-closing states (k_{E-b} , b, d, and f).

自闪烁过程，即罗丹明染料螺环化开关环过程，其转换过程驱动力来源于分子热振动平衡，因此转换速率与分子本身结构密切关联。传统的酸解离平衡常数 pK_a ，仅仅反映了平衡态下罗丹明开关环分子分布特征，并不能够从动力学上说明螺环化平衡过程的变化速率。为此，基于酸碱干扰方式扰动达到平衡态的染料溶液，通过测量溶液荧

光变化，以分析螺环化平衡的动力学速率。STMR 作为磺酸罗丹明典型代表（其它未列出磺酸罗丹明测量结果可参见郑莹博士论文），其与 Rh-Gly、HMSiR 对比测量结果如图 41 所示。相比于 STMR ($k_{E-a} = 0.47 \text{ s}^{-1}$) 和 HMSiR ($k_{E-a} = 0.30 \text{ s}^{-1}$)，Rh-Gly 展示了最慢的酸扰动平衡转换速率 ($k_{E-a} = 0.00022 \text{ s}^{-1}$)。较慢的转换速率揭示了 Rh-Gly 在单分子定位超分辨成像中重构的失败原因，在成像的时间周期内，因过慢的转换到亮态速率，无法收集完全 Rh-Gly 分子信号。现对而言，三种染料均展现出较快的碱扰动转换速率 ($k_{E-b} = 0.50 - 1.6 \text{ s}^{-1}$)，说明染料在亮态持续时间跨度有限，可以通过热力学平衡过程循环构建符合成像预期的稀疏亮态事件。然而，这些速率是在分子群体水平上对平衡扰动后迁移速率研究，不是绝对的自闪烁罗丹明染料分子螺环化开关环速率。

3.4 单分子尺度螺环化动力学研究

为在单分子尺度上调查自闪烁的动力学特征，STMR、Rh-Gly 和 HMSiR 被标记在 Halo 蛋白上，然后以稀疏方式吸附到盖玻片表面。值得注意的是，当以相同稀释度处理 Rh-Gly 时，成像获取的单分子信号极少，这说明极少数 Rh-Gly 分子能够在成像时间内开环转换到亮态。为测量 Rh-Gly 的单分子光物理性质，Rh-Gly 的样品适当程度提高了附着浓度以匹配另外两种染料的单分子统计数量（图 42a）。三种染料蛋白复合物典型的单分子荧光轨迹可见图 42b，其中 Rh-Gly 仅出现一次亮态过程，而 HMSiR 和 STMR 则出现大量亮暗态转换的闪烁过程。这三种染料中特别突出的是 STMR，它展现了大量亮暗态转换闪烁次数，统计可发现该染料的平均闪烁次数可达到 54.8 次 (500 W/cm²；图 42c)。差异化的闪烁次数揭示了 Rh-Gly 缺乏“自闪烁”过程。同时，在不同的激发光照明强度下，这些染料的闪烁次数绝对次序保持相对一致（图 42d）。然而，直接用闪烁次数评价染料自闪烁功能不妥，因为这个性质虽与染料结构密切关联，但其与测量时施加的激发光强也有明显联系，因而不利于用来评估染料自闪烁功能的成像潜质。

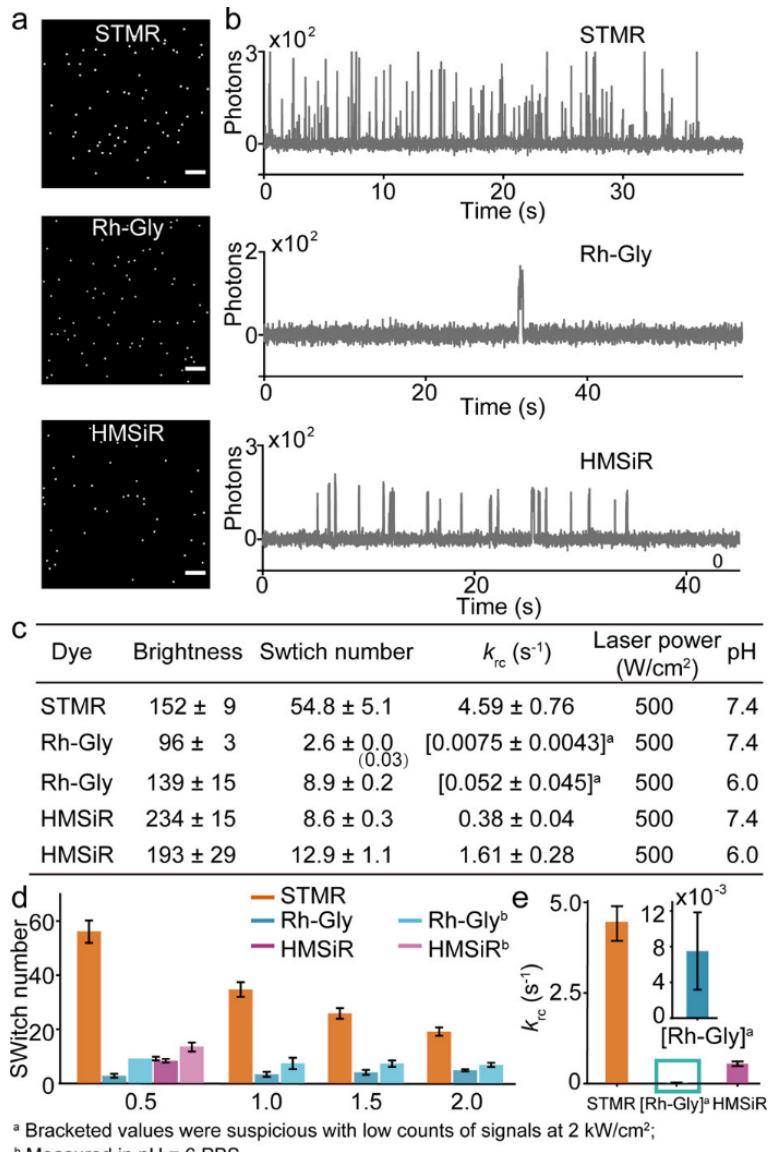


图 42. STMR、Rh-Gly 和 HMSiR 的单分子光物理性质研究。

Fig 42. Single-molecule photophysical studies of STMR, Rh-Gly, and HMSiR bonded to Halo-proteins.

(a) Max projection view of imaging stacks shows the sparse distributed single-molecule fluorescent signals. Typical fluorescence trajectories (b) and the summary of single-molecule characteristics (c) of three rhodamines. (d) Switch number of three dyes under various laser powers. (e) The recruiting rate of STMR, Rh-Gly, and HMSiR under 500 W/cm² irradiation. Scale bars: 5 μm.

基于对自闪烁染料单分子荧光特征的重新审视,研究发现这些具有自发热力学开环过程染料,它们首次从暗态转换到亮态的时间,反

映了染料从分子关环暗态自发随机转换到开环亮态的热力学过程。由于这个过程分子随机转换到可被识别定位的亮态,好似应征召入伍过程,因而把这个自闪烁染料激活速率概念定义为招募速率 (recruiting rate, k_{rc})。

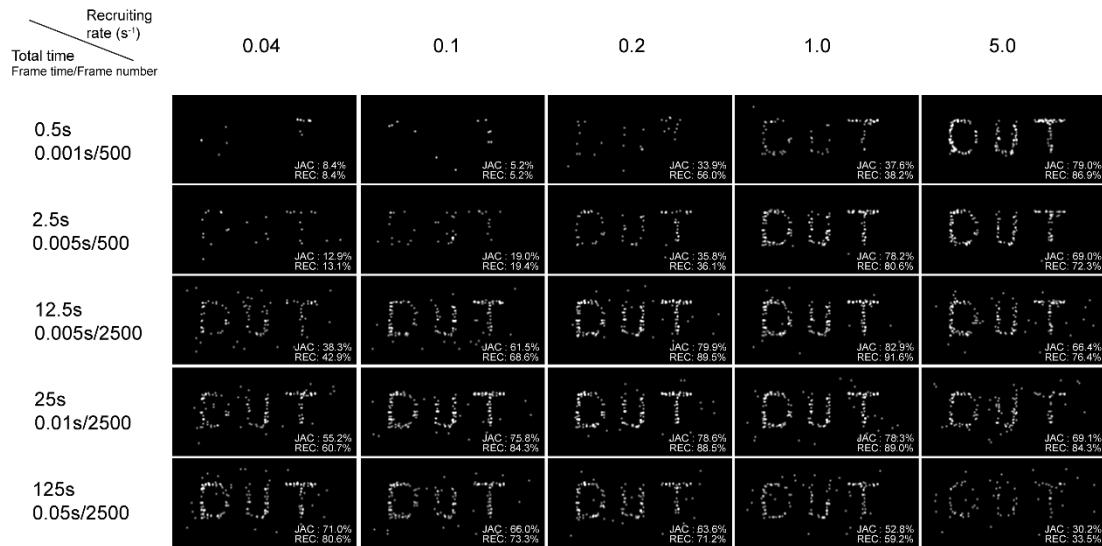


图 43. 理论模拟招募速率对于超分辨重构影响

Fig 43. Theoretical simulation on super-resolution reconstruction regarding the recruiting rate versus imaging acquisition time.

To understand the impact of recruiting rate for super-resolution reconstruction, the blink kinetics were simplified to one blink for each molecule. Thus, ideal condition was hypothesized ($k_d = 0.001 \text{ s}^{-1}$; $k_r = 0.001 \text{ s}^{-1}$; $k_b = 100 \text{ s}^{-1}$) in the simulation to form probable one blink for each molecule. A few molecules exist more than one frame were merged in localization analysis. Scale bar: 0.5 μm .

为了阐释这个概念,通过理论模拟了不同招募速率下的超分辨成像重构结果。图 43 展示了理论模拟结果,纵轴表示不同的超分辨成像时间设置,而横轴表示染料不同的招募速率。为了清晰表明招募速率对于成像重构的影响,这里的理论模拟使用了简化的单分子闪烁模型,所有的染料在模拟中只能完成一次闪烁过程。图中可以看出,沿着对角线上的重构展现出相对较优的结果,相应招募速率染料可以在对角线上对应的成像时间分辨率上对结构完成理想的重构,其重建率 (Reconstruction index, REC) 可超过 80%,定位与真实染料位置的映射对应率 (Jaccard index, JAC) ^[118]可达到 70%以上。然而,在较

快招募速率和较慢成像时间设定 ($k_{rc} = 5.0 \text{ s}^{-1}$, 125 s) 和较慢招募速率和较快成像时间设定情况下 ($k_{rc} = 0.04 \text{ s}^{-1}$, 0.5 s), 染料均不能在模拟中完成对结构的超分辨成像重构。这是由于招募速率决定了染料的单分子信号时间分布特征, 当其速率很快时, 在长曝光时间内染料信号几乎同时出现, 不满足成像的稀疏度条件; 而当其速率较慢时, 在短成像时间内, 没有充分的染料分子转换到开环亮态。基于模拟结果可见, 招募速率决定了自闪烁罗丹明染料超分辨成像特征, 以速率绝对值可判断染料适用的时间分辨率。

实验中, 招募速率可通过测量首次转换到亮态事件的时间概率密度分布获取, 而对于 STMR、Rh-Gly 和 HMSiR 三种染料的招募速率比较结果可参见图 42e。相较于 Rh-Gly ($k_{rc} = 0.0075 \text{ s}^{-1}$), STMR ($k_{rc} = 4.59 \text{ s}^{-1}$) 和 HMSiR ($k_{rc} = 0.38 \text{ s}^{-1}$) 展现出对快速的招募速率, 可满足活细胞相对快速超分辨成像的需求。而 Rh-Gly 由于其招募速率过低, 基本不能满足超分辨成像实验的时间分辨率需求, 因而不适用于活细胞成像实验。此外, 所有测试染料的招募速率显示出独立于激活光强特性, 这说明招募速率反映了染料螺环母体结构本征的热力学开环动力学性质。

为排除环境干扰因素对招募速率动力学差异影响, 下面尝试调控参与平衡过程的氢质子浓度, 依据染料 pK_a 统一测量条件下各染料的热力学平衡状态, 确定这些染料的招募速率差异性。由于招募速率反映的染料热平衡动力学特征, 很可能其受到热力学平衡过程参与的氢质子浓度的干扰。对于三种染料, 他们具有不同的 pK_a , 在中性 pH 条件下有不同的开环分子比例, 引起不同热力学平衡态下不同的分子开环比例对招募速率影响的担忧。为鉴别该影响因素, 调节 Rh-Gly 与 HMSiR 所在环境的 pH 至 6, 使得这两种罗丹明与 STMR 具有相似开环比例, 然后测定在这种条件下染料的招募速率。其结果可见图 42c, 虽然氢质子浓度增加, 但 Rh-Gly 的招募速率未见明显提升, 仍然过于缓慢 ($k_{rc} = 0.052 \text{ s}^{-1}$), 不能够满足成像定位需求。而 HMSiR 依旧展现出位于三种染料中中等的转换速率, $k_{rc} = 1.61 \text{ s}^{-1}$, 可以匹配超分辨成像需求。三种染料相对而言未改变的招募速率绝对值顺序, 说明染料分子母体结构差异, 才是导致热振动转换到开环过程动力学差异性的决定性影响因素。

为了更深入理解自闪烁罗丹明染料的闪烁特征, 基于简单自闪烁染料模型(图 44a), 对磺酰胺罗丹明以及典型自闪烁罗丹明(Rh-Gly、HMSiR 和近期 Johnsson 团队发展的 MaP 系列染料 MaP33, MaP555)进行了闪烁动力学研究。对于自闪烁罗丹明染料, 处于基态的关环暗态分子可通过 k_{rc} 以热力学平衡热运动方式转换到亮态, 然后在亮态被持续激发后, 随机经过 k_d 速率转换到暗态或者经过 k_b 发生漂白。而亮态转换后形成的染料暗态, 可通过 k_r 恢复到亮态。

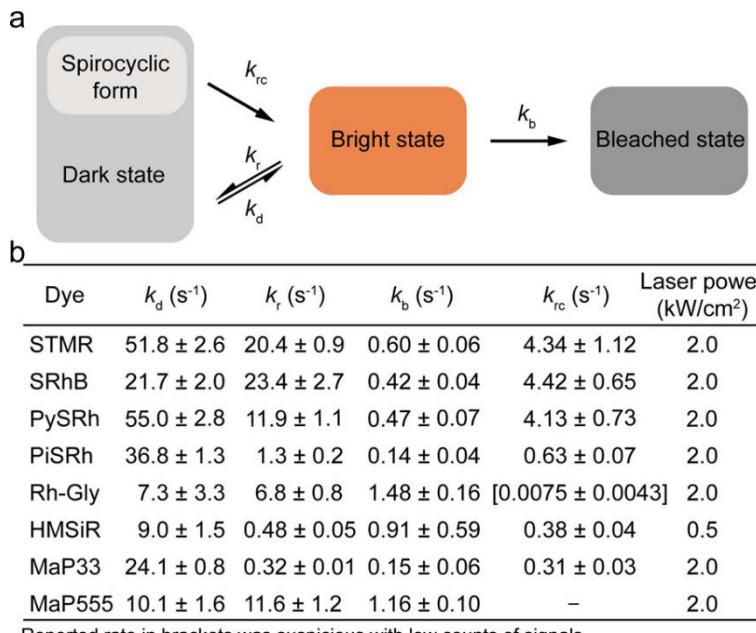


图 44. 磺酰胺罗丹明和典型自闪烁罗丹明染料的闪烁动力学特征
Fig 44. Blinking kinetics of sulfonamide rhodamines and typical self-blinking rhodamines.

(a) Schematic illustration of the kinetic model for self-blinking. (b) Summary of single-molecule kinetics.

自闪烁罗丹明染料的闪烁单分子动力学速率测量结果列在图 44b 中, 磺酰胺罗丹明总体展现出比经典自闪烁罗丹明染料更快速的闪烁动力学特征。所有的磺酰胺罗丹明展现出 $k_d > 20 \text{ s}^{-1}$, 同时 STMR、SRhB 和 PySRh 也展现出快速的恢复亮态过程, 他们的 $k_r > 10 \text{ s}^{-1}$ 。相较于 HMSiR 等经典自闪烁罗丹明中等的闪烁速率, 磺酰胺染料快速闪烁过程有利于快速活细胞超分辨成像, 以及高时间分辨率成像的需求。此外, 这些染料展现出不同比例的 k_d/k_r ($\sim 1 - 28$), 可

提供不同程度稀疏度,适应于不同浓度比例下的单分子定位超分辨成像。

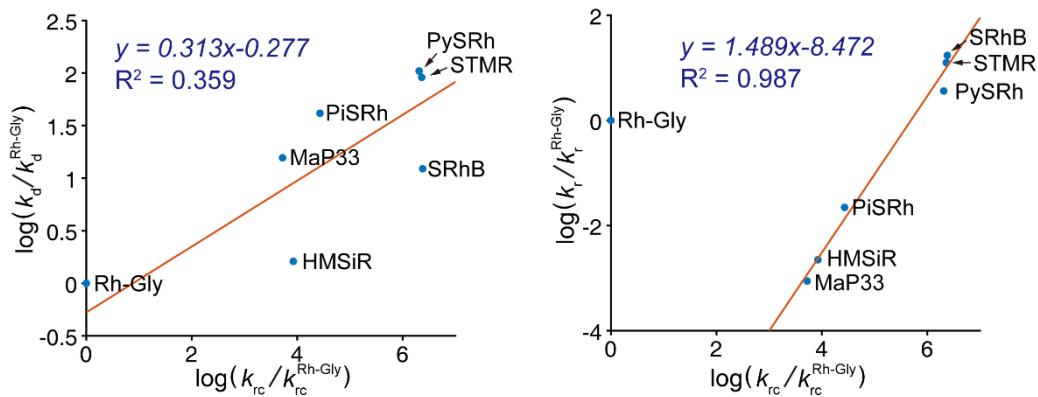


图 45. 闪烁速率 k_b 、 k_r 与招募速率 k_{rc} 的关联探索

Fig 45. Investigation of the correlation between blinking rates (k_b , k_r) and k_{rc} .

Since Rh-Gly has the smallest k_{rc} , its blinking rates were implemented as the basis for the calculation. The rates were transformed to natural logarithm form to search for the dependence.

为解析自闪烁罗丹明染料闪烁与分子本身的热力学螺环开关环平衡过程的联系,对招募速率(k_{rc})与闪烁动力学(k_r 、 k_d)之间的关联进行了分析尝试。为消除其它环境因子的干扰,只关注结构导致的影响,速率均体现为相对于 Rh-Gly (具有最小的 k_{rc}) 速率的相对值。结果如图 45 所示,除了 Rh-Gly 之外,自闪烁罗丹明染料的招募速率与染料闪烁过程暗态转换到亮态 k_r 存在线性对应关系($R^2 > 0.98$),这显示出染料自身开环热力学过程强烈地影响了染料闪烁过程从暗态转换到亮态速率。同时,这也说明染料的自身热力学平衡对超分辨成像单分子闪烁过程有显著影响。而对于 Rh-Gly,这个染料恢复速度过慢,且不在线性区间范围,说明了超分辨成像闪烁过程的复杂性。当染料的开环热力学平衡速率过慢,不足以作为主要恢复过程时候,染料从暗态转换到亮态恢复过程会被其它因素干扰(例如染料的亚稳态亮态持续性、环境其它分子的热振动等)。而对于自闪烁染料从亮态转换到暗态过程,招募速率没有明显显示出线性的对应关系,但从拟合结果看,自闪烁罗丹明染料具有快速招募速率的,其亮态持续时间也相对较短,亮态会以较快速率转换到暗态。这种模糊的趋向性可

能与染料开关环过程历经相似中间态有关,这样每种染料的招募速率有可能一定程度上反映了染料自身热力学关环过程动力学。基于这种模糊倾向性,也可以说明自闪烁染料的单分子荧光闪烁过程与他们在热力学平衡状态下的开关环过程有密切关联。自闪烁罗丹明的螺环化热力学平衡对于这类染料的单分子荧光闪烁至关重要,同时招募速率也反映了自闪烁罗丹明染料分子本身的开环动力学特征,是评估自闪烁染料自闪烁功能的核心参数。

3.5 磺酰胺罗丹明蛋白标签超分辨成像研究

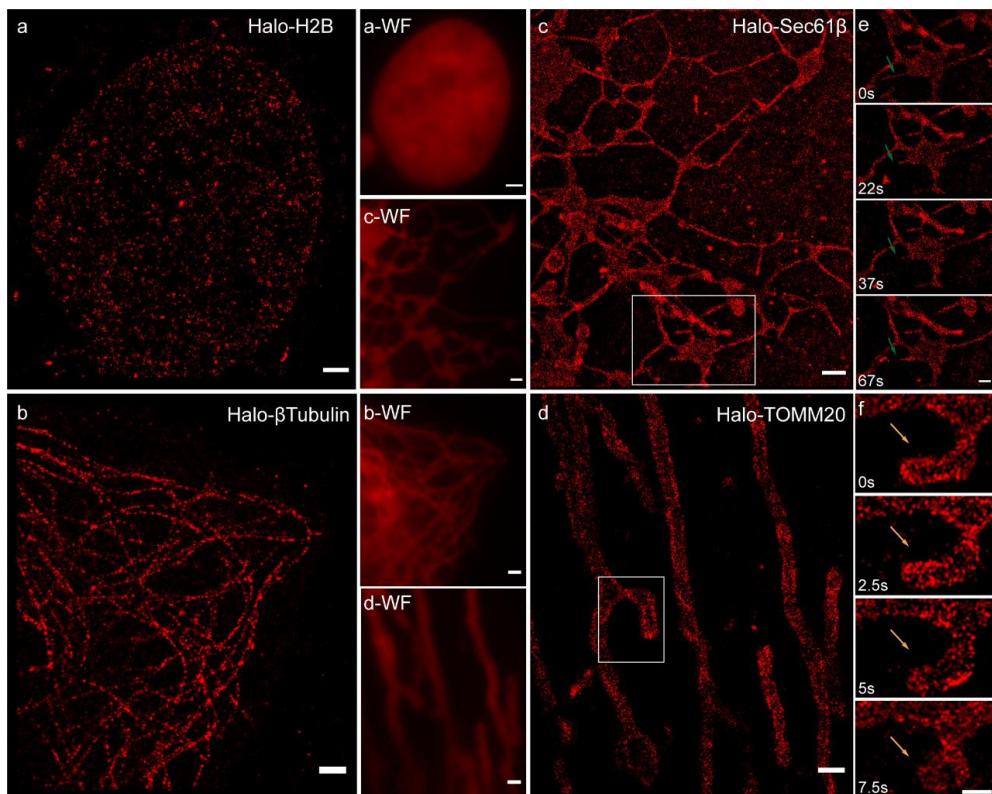


图 46. STMR 基于 Halo tag 蛋白标签技术实现对活细胞亚细胞结构超分辨成像
Fig 46. Super-resolution imaging of living cells labeled with STMR through Halo-tag technology.

Super-resolution reconstruction reveals the distribution of nucleus H2B (a), microtubules (β Tubulin, b), the morphology of endoplasmic reticulum (Sec61 β , c), and mitochondrial outer membrane (TOMM20, d) proteins in live HeLa or Vero cells. The insets (overlaid with labels suffixed with WF) represent the wide-field images from the same location for the corresponding reconstruction. Time lapse images of endoplasmic reticulum (e) and outer mitochondrial membrane dynamics (f). Scale bars: 1 μ m (a-d); 0.5 μ m (e, f).

基于磺酰胺罗丹明快速招募速率预期,这类染料可满足对活细胞的蛋白标签超分辨成像,尤其是面向具有相对快速运动特征的亚细胞器。在此类成像中,磺酰胺罗丹明的快速招募过程,可以提升成像的时间分辨率提升,满足动态成像需求。

基于上述预测,以 STMR 为例,对磺酰胺罗丹明的超分辨成像能力进行了研究。细胞的标记通过 Halo tag 蛋白标签策略实现,标记对象包括细胞核 (H2B)、微管 (β tubulin)、内质网 (Sec61 β) 和线粒体标志性蛋白 (TOMM20)。活细胞中的成像结果如图 46 所示,相较于传统荧光成像 (Wide-field, WF),超分辨成像结果清晰揭示了细胞核组蛋白分布特征、微管交叉重叠结构、内质网节点和片层结构以及线粒体外膜蠕虫样特征。不仅如此,STMR 还可以实现对内质网和线粒体外膜的动态成像观察,以超高分辨率解释内质网小管的伸缩运动和线粒体的摆动过程中特征蛋白分布特征。

3.6 总结

很长一段时间内,研究者默认采用 $pK_a < 6$ 的定义作为自闪烁罗丹明的标准。然而, Rh-Gly 的超分辨成像重构结果却挑战了默认定义体系:这种罗丹明满足传统 pK_a 定义,却只能在成像中提供稀少的闪烁信号,不足以匹配超分辨成像对于自闪烁性能需求。基于上述事实,酸性解离常数 pK_a 不是定义自闪烁过程的绝对标准。

为挖掘真正决定自闪烁过程的物理本质,本章通过对一系列磺酰胺罗丹明以及典型自闪烁罗丹明 (Rh-Gly、HMSiR 以及 MaP 系列染料) 进行分子群体和单分子尺度动力学研究,发掘表征分子自闪烁过程绝对速率的招募速率 k_{rc} 。这个新参数对应于自闪烁罗丹明分子基于热力学过程从关环暗态转换到开环亮态的动力学特征,并且不受激发光影响,是表征分子本征动力学特性的参数。通过对自闪烁罗丹明染料招募速率以及闪烁动力学的关联研究,验证了招募速率反映的自闪烁罗丹明螺环化热力学平衡对于单分子荧光闪烁的决定性影响,阐释了招募速率作为衡量自闪烁罗丹明染料超分辨成像功能的价值。基于闪烁动力学以及招募速率预测,磺酰胺罗丹明在实验中对细胞核、微管、内质网、线粒体外膜的高质量活细胞超分辨成像。

招募速率表征分子结构导致的螺环化开环动力学绝对差异性,可

用来评估罗丹明染料的自闪烁功能特性，并对超分辨成像潜力给出预测。这个新速率为自闪烁罗丹明设定新的衡量标尺，并将协助未来染料研究者推动自闪烁罗丹明染料的进化。

4 红细胞膜分子诊断

4.1 前言—红细胞膜超分辨成像的难点

血液常规检查则是最为广泛应用的诊断技术，可为疾病种类、进展和治疗效果判断提供精准信息。而红细胞则是血液常规检查的核心对象，它的形态和功能反映了人体的健康水平^[119,120]。然而，传统的血液检查仅仅针对细胞整体形态、变形性和血红蛋白水平^[121,122]，忽视了细胞膜表面超微结构和动力学特征。这些细节结构和动力学变化支撑红细胞运输功能^[123-125]，通过对这些细节信息的分析和诊断有可能探索疾病的提前预警，以单个红细胞微观层次评估人体整体的生命活动水平。

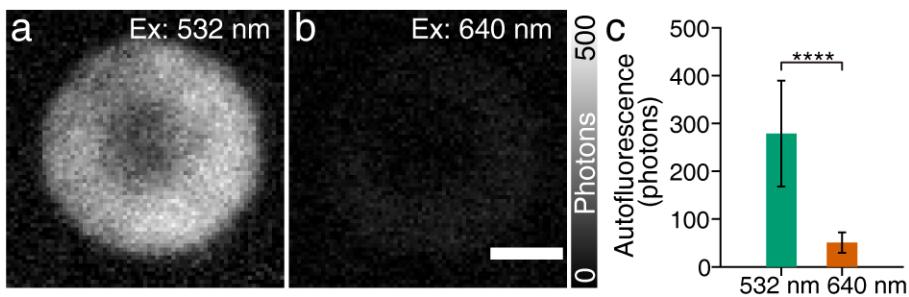


图 47. 红细胞的自发荧光

Fig 47. Autofluorescence of RBCs.

The fluorescence from an RBC excited under a 532 nm (a) or 640 nm (b) laser. The powers of two excitation lasers were adjusted to be identical ($\sim 0.8 \text{ kW/cm}^2$). (c) Comparison on the average autofluorescence of RBCs when excited at different wavelengths. Significance was determined through a two-sample t-test with $P < 0.0001$ **** (sample size $n = 214$ RBCs). Scale bar: $2 \mu\text{m}$.

传统的光学成像的粗糙分辨率不能够精确解析红细胞膜表面的异质性结构和动力学特征。为此，应当使用超分辨成像技术来对红细胞膜分子诊断，通过单分子定位重构膜超微结构和通过单分子追踪分析膜动力学特征。最近，Xuke 团队^[126]使用 CM-DiI 对固定红细胞膜表面进行了多色超分辨成像分析，揭示了红细胞膜表面的细胞骨架连接。然而，对活红细胞膜的分子诊断直至目前仍然未能完成。究其原因，受限于红细胞本身的自发荧光（图 47）和活红细胞的流动性细胞膜特征（图 48）。红细胞含有大量的血红蛋白，在单分子定位成像的激发光照明下，会产生不可避免的自发荧光背景，对成像产生干扰；

而红细胞膜表面的流动光滑特征,使得红细胞并不易于贴附于成像介质(盖玻片)表面,从而在成像时产生漂移扰动,干扰重构的精确度。

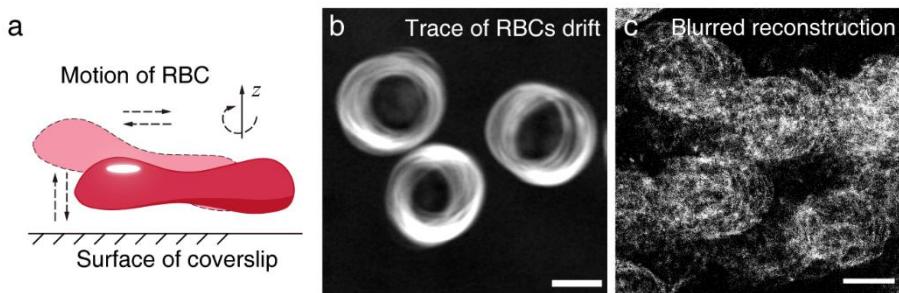


图 48. 红细胞在盖玻片表面的运动

Fig 48. Motion of RBCs on coverslip.

(a) Illustrative chart presents the probable motion of RBCs during imaging acquisition. (b) Overlaid edges of RBCs during 1.5 min in a static buffer. (c) Blurred super-resolution reconstruction of RBC membranes due to motion. Scale bars: 5 μ m.

为解决活红细胞膜分子级别诊断难题,应当发展具有远红发光的超分辨成像荧光染料,且同时满足单分子定位超分辨成像和单分子追踪成像需求。而一个不利的事实是,单分子定位要求染料荧光发射在时空中稀疏化,而单分子追踪要求染料单个分子持续发光,这两种性质似乎互不兼容,对染料设计提出极高要求。另一方面,对于活红细胞悬浮特性,需要通过无创捕获方式抓取,并在成像时间内相对固定红细胞,这也为设计捕获红细胞装置提出了相当大的挑战。

4.2 适用于红细胞膜分子诊断氟硼吡咯染料设计

分子诊断中需要同时单分子定位和追踪,而这二者对染料提出兼备单分子闪烁和亮态长程发光的要求^[11,127] (图 49a)。但在无外加辅助成像液或氧气清除环境下,几乎没有传统的荧光染料能够达到这两项技术对于单分子发光的要求。过去的超分辨成像染料,设计往往只针对定位或追踪单一需求:例如自闪烁罗丹明染料^[109],这类染料针对其闪烁特征开发而忽视了其亮态持续发光能力,不具备长程单分子追踪成像能力;自修复染料^[81]通过连接三重态猝灭基团,延长染料亮态持续时间,但自修复染料不具备闪烁能力,很难形成稀疏信号用于单分子定位成像。开发兼备单分子定位和追踪功能的染料直到目前仍然是一个艰难的挑战。

氟硼吡咯类染料(图49b)具有良好的光稳定性和亮度^[128],是发展分子诊断探针的良好母体。但是这类染料往往展现出较弱的光转换闪烁功能,不能直接应用于单分子定位超分辨成像需求。过去几年间,为了改善这类染料的单分子尺度荧光功能,染料研究者对染料进行多次的再修饰开发。其中, Xu Ke 课题组^[129]通过对3/5位置延展吡咯共轭,通过键的扭曲获取了具备单分子光转化功能的氟硼吡咯染料(图49c); Smith 和 Winter^[130], Zhang 和 Raymo^[131]等课题组也发展了具有光激活特性的新型氟硼吡咯染料。然而,这些染料的一个重要问题是它们是否具有长程亮态,满足分子诊断中单分子追踪的需求。

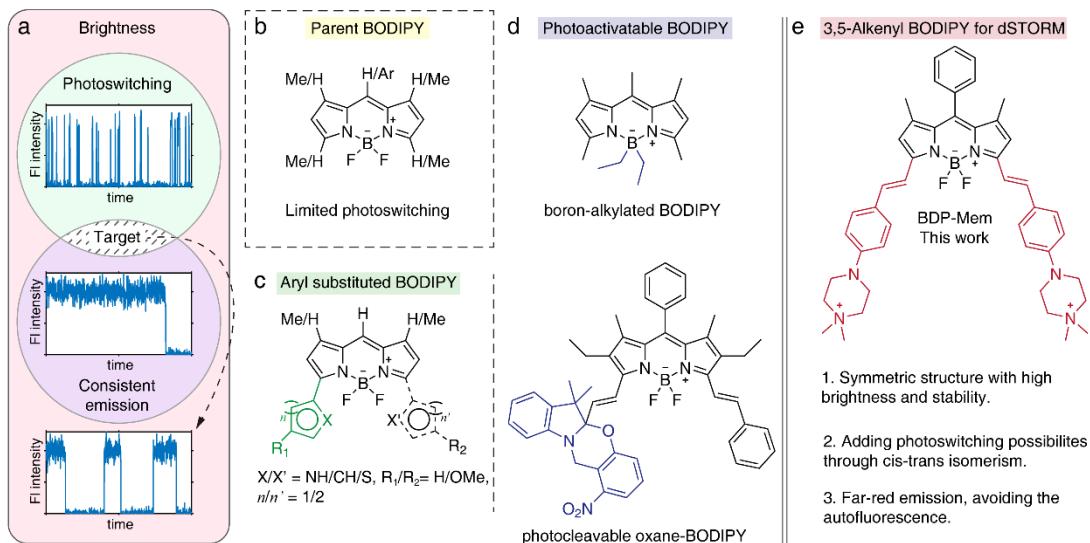


图49. BDP-Mem 染料的分子设计策略

Fig 49. The molecular design strategy of BDP-Mem.

(a) The conflicting requirements of blinking and persistent emission for single-molecule super-resolution imaging and long-term single-molecule tracking.

Molecular structures of parent BODIPY (b), core conjugation system of aryl substituted BODIPYs (c) and photoactivatable BODIPYs (d) for localization super-resolution imaging. (e) The molecular structure of BDP-Mem.

为发展同时解决单分子定位和追踪的氟硼吡咯染料,同时满足红细胞成像需要的远红发光的需要,基于氟硼吡咯荧光团母体设计了一种新型 BDP-Mem 染料(图49e)。该染料保留了氟硼吡咯的母体结构,因为这种结构具备有亲脂性,有利于它对于膜磷脂层烷基化内侧插入。同时,通过对氟硼吡咯3,5位置衍生苯乙烯基团,利用3,5

位置双键的顺反异构旋转，实现单分子尺度的亮暗态转变。在衍生苯乙烯对位，修饰甲基哌嗪供体，通过供电子效应取代基引入，将染料母体设计成具有显著推拉电子体系染料，从而实现光谱的红移。将甲基哌嗪非芳香胺基转化为季铵盐，增强染料的水溶性，是染料在膜上停留而非穿膜，同时基于季铵盐的吸电子诱导效应，抑制分子扭曲电荷态（twisted intramolecular charge transfer, TICT）^[132]的非辐射跃迁过程，增强染料的亮度。

BDP-Mem 染料的合成路径如图 50 所示。通过克莱森酯缩合将对甲基哌嗪苯乙烯连接到氟硼吡咯 3, 6 位，生成 P-BDP；然后，通过碘甲烷在 DMF 溶剂中对甲基哌嗪季铵化，即可获得 BDP-Mem。

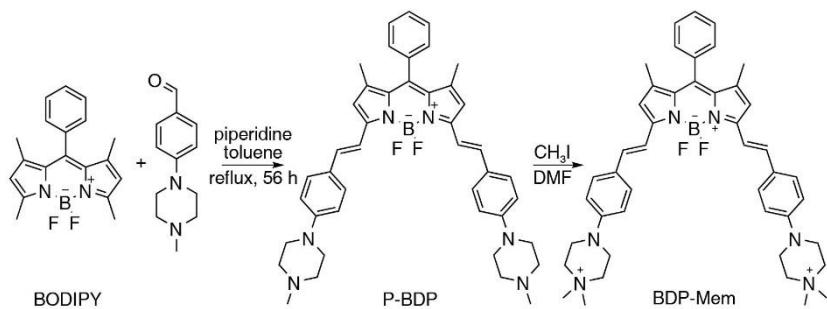


图 50. BDP-Mem 染料合成路径

Fig 50. Synthesis of BDP-Mem

BDP-Mem 的光谱研究结果表明新染料具有预期的远红荧光发射，且在非质子性溶剂中具有较好的亮度。表 1 列出光谱测量结果，BDP-Mem 在非质子溶剂（二氯甲烷、乙腈、二甲基亚砜）以及质子溶剂（甲醇、水、磷酸缓冲液 PBS）中均具有大于 650 nm 的吸收和荧光峰 (λ_{ab} 和 λ_{em})。BDP-Mem 也具有很高的吸光度，其摩尔消光系数 ϵ 在除 PBS 缓冲液外体系中，均大于 $8.0 \times 10^4 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ 。相较于质子溶剂，在非质子溶剂中，BDP-mem 展现出 > 0.2 荧光量子产率，同时在中等极性二氯甲烷溶剂中，其量子产率可超过 0.5。这种荧光量子产率差异保证染料在嵌入中等或低极性磷脂烷基长链中的荧光亮度，同时减少新染料本身在染色溶剂（例如，PBS 缓冲液）中形成的背景噪音。

表 1. BDP-Mem 在不同统计中的光谱性质
Table 1. Spectral properties of BDP-Mem in various solvents

Solvent	λ_{ab} (nm)	λ_{em} (nm)	$\epsilon \times 10^4$ ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)	Φ
DCM	650	671	12.2	0.52
Methanol	652	681	11.5	0.54
Acetonitrile	654	685	13.5	0.44
Water	651	711	8.9	0.05
DMSO	677	727	12.5	0.21
PBS	686	- ^a	4.7	- ^a

^a The long-wavelength fluorescence (red shifted normal fluorescence compared to absorption) of BDP-Mem in PBS was negligible, except for a blue shifted fluorescence peaked at 676 nm, which is probably induced by the aggregation of BDP-Mem molecules.

基于 BDP-Mem 良好光谱性质, 对新染料的膜染色效应进行了光谱研究。模型膜通过脂质体(人造囊泡)^[133]和红细胞“鬼影”(“ghost”)^[134]构建获得, 脂质体的构建膦酯包括 1,2-二油酰基-*sn*-丙三基-3-胆碱磷酸 (1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine, DOPC)、鞘磷脂 (sphingomyelin, SM) 和胆固醇 (cholesterol, Chol)。首先, 通过单一膦酯 DOPC 构建 $< 200 \text{ nm}$ 脂质体, 对 100 nM BDP-Mem 染料 PBS 溶液以 DOPC 浓度为基准滴定脂质体, 获取 BDP-Mem 对人造膦酯囊泡的荧光染色饱和曲线(图 51a)。结果显示当膦酯为染料浓度的 100 倍时达到对 BDP-Mem 的饱和吸附, 接着以饱和比例膦酯研究 BDP-Mem 对不同有序程度脂质体的着色效应。图 51b 展示了 BDP-Mem 在不同组分人造脂质体的荧光发射光谱, 在液态无序 (liquid-disordered, Ld) 脂质体膜 (DOPC/Chol) 上, BDP-Mem 显示出 4 nm 的光谱蓝移 ($\lambda_{em} = 720 \text{ nm}$) 相比于液态有序的脂质体膜 (SM/Chol)。相较于有序膜, 在更为无序的脂质体膜 (DOPC) 上, BDP-Mem 显示出 1.7 倍增强的荧光发射, 这显示出染料很可能嵌入无序膜的膦酯烷基链, 使得无序膜的烷基链稳定荧光团的荧光发射。但在对同时具有无序和有序相的大单层囊泡 (Giant unilamellar vesicles, GUVs) 染色成像时(图 51b 子图), BDP-Mem 显示出较为均匀的着色效应, 这说明染料在对膜的有序无序相无明显倾向性。基于 BDP-Mem 对于人造囊泡的良好着色效应, 下面研究该染料对于天然囊泡, 即红细胞“鬼影”的荧光着色效应。如图 51c 所示, BDP-Mem 在红细胞“鬼影”染色后呈现出吸收和荧光的增强, 荧光增强倍数可达到 3 倍。

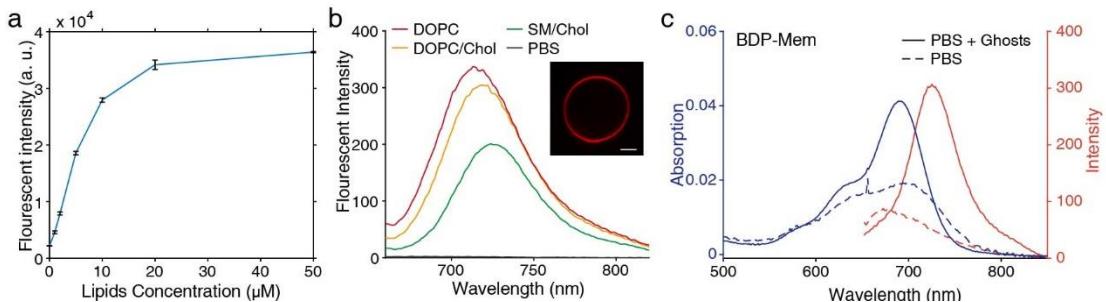


图 51. BDP-Mem 对人造和天然磷脂囊泡的荧光染色效应研究

Fig 51. Fluorogenicity of BDP-Mem on artificial and natural liposomes.

(a) The fluorescence response of 100 nM BDP-Mem on staining artificial liposomes at different DOPC lipid concentration. The inset shows a confocal fluorescent image of a GUV stained by BDP-Mem. (b) The fluorescence spectra of BDP-Mem on LUVs with different lipids composition (DOPC: Chol or SM: Chol=1: 0.9). (c) Absorption and fluorescence spectra of BDP-Mem upon staining RBC Ghosts. Scale bar: 3 μm .

离体光谱测量结果显示 BDP-Mem 具有良好的磷脂膜染色效应，那这种染料在对活红细胞染色会出现怎样的情况呢？为此，将新染料 BDP-Mem 与商品化同样远红发射区间 DiD 染料一同对活红细胞染色，并通过共聚焦成像比较它们的差异。图 52 展示了典型的成像结果，BDP-Mem 显示出比 DiD 更好的红细胞着色效应，新染料红细胞膜表面荧光亮度比 DiD 高 8 倍。

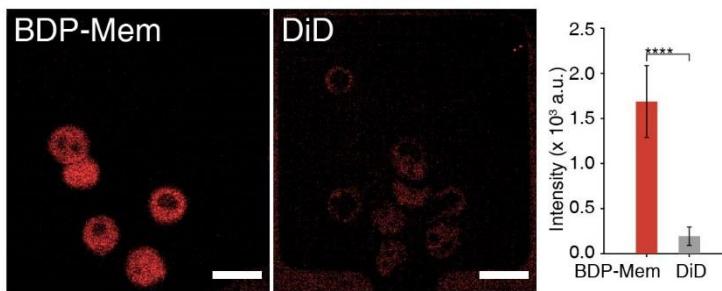


图 52. BDP-Mem 对红细胞染色成像

Fig 52. Fluorescent image of live red blood cells stained by BDP-Mem.

Scale bar: 10 μm .

4.3 分子诊断探针单分子光物理性质研究

新染料的单分子光物理性质，尤其是它在膜上的单分子荧光特性，将是实现同时单分子定位和追踪的关键。为了模拟膜内外的环境差异，将 BDP-Mem 分散于聚乙烯醇聚合物中，利用聚乙烯醇对水分子吸附

力, 形成湿润膜和干燥膜, 分别模拟膜外水环境和膜内烷基化环境。新染料的单分子光物理性质结果总结在图 53a 中。在干燥接近膦酯内部环境的聚乙烯醇膜上, BDP-Mem 展示出更强的单分子爆发力 (440 photons/40 ms) 和总收集光子数 (1.3×10^5 photons)。不仅如此, 新染料还在干燥膜上展示出接近 5 倍延长的亮态时间 (4.95 s, 图 53b), 这种延长的亮态持续时间显然有利于染料实现单分子追踪分析。而在延长染料亮态持续时间的前提下, BDP-Mem 仍然展现出一定程度的亮暗态光转换能力, 在干燥膜上的闪烁次数可达到 4.4 次, 显示出染料具有形成稀疏单分子定位信号能力。图 53c 展现一个发生多次光转换过程 BDP-Mem 染料分子的典型时间荧光轨迹。

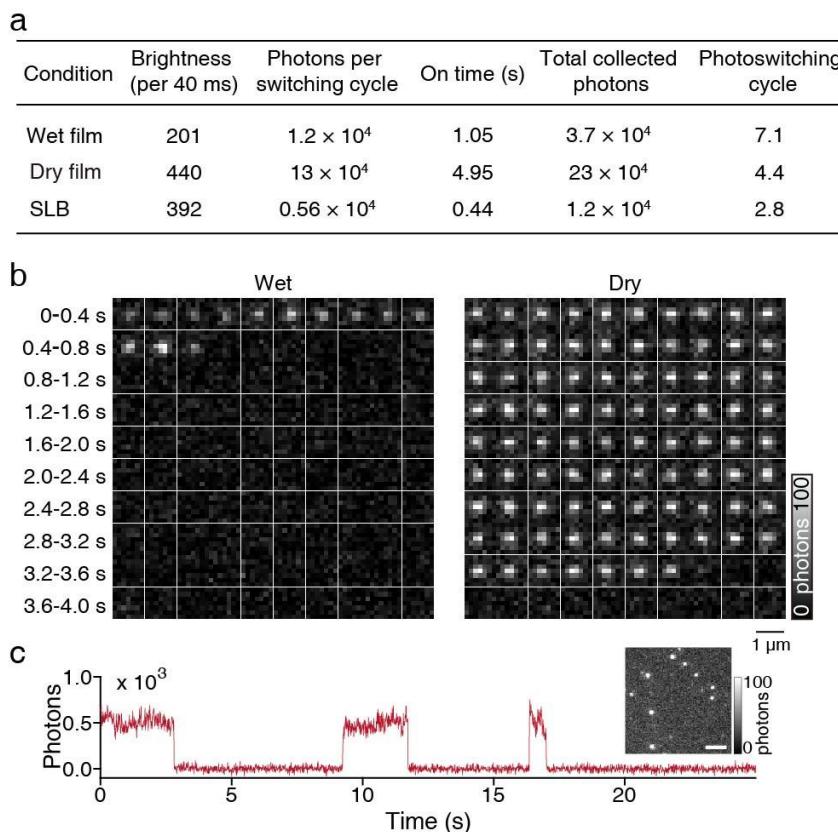


图 53. BDP-Mem 在膜上的单分子光物理性质研究

Fig 53. Single-molecule photophysics of BDP-Mem on membranes.

(a) Summarized single-molecule characteristics of BDP-Mem. (b) Time-series stack images of typical BDP-Mem molecules on a wet or dry film. (c) A single-molecule intensity trajectory of BDP-Mem on a dry film. Inset shows dispersed single-molecule signals. Scale bar: 3 μ m.

为了进一步确定 BDP-Mem 染料在生物膜上的单分子光物理性质，这种染料被分散在盖玻片玻璃表面支撑的膦酯双层膜 (supported lipid bylayer, SLB) 上，并研究这种环境下它的单分子光物理性质。虽然在更为接近生物膜体系的人工构建膜上，BDP-Mem 展现出爆发力的略微下降，但其亮态持续时间仍然长达 0.44 s，适用于单分子追踪的需求（假定 10 ms 单帧收集时间，可追踪 >40 帧信号）。同时，BDP-Mem 也展现出 2.8 次的光转换过程，加之染料分子存在对膜着色的附着解离过程（染料分子漂白后再次附着染色新染料的可能）可能持续为成像提供新的信号，BDP-Mem 具有很好的单分子定位成像潜力。

4.4 捕获红细胞微流控芯片

限制红细胞超分辨成像另一个关键问题是它的不贴壁特性。活红细胞悬浮分散在缓冲液中，并且在成像中会产生运动，从而模糊成像结果。另一方面，沉降的红细胞距离全内反射显微镜的隐失场（通常小于 300 nm）仍有一定距离，而全内反射成像则是提升单分子定位及其它超分辨成像信号信噪比，是高质量成像关键。

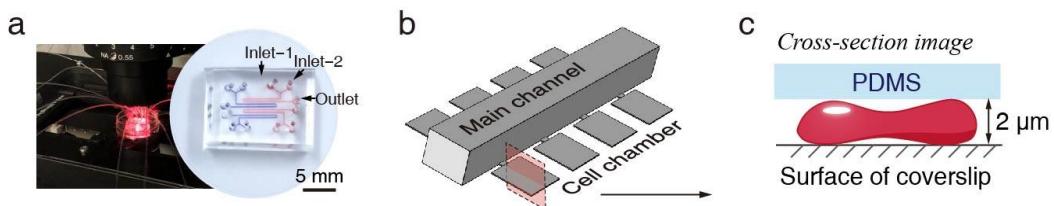


图 54. 捕获红细胞微流控芯片

Fig 54. Microfluidic chip for capturing RBCs.

(a) Implementation of a microfluidic chip for imaging. An example of microfluidic chip filled with red or blue ink is shown on the right. (b) Schematic chart depicts the geometry of one channel. (c) Cross- section view of a cell chamber.

在此发展一种具有捕获红细胞功能的微流控芯片（图 54a），这种芯片由四个主通道，每个主通道两侧具有 40 个小腔室（图 54b）。将腔室约束在 2 μm 高度以物理“固定”红细胞，同时通过小腔室和主通道的液体快速交换，实现对红细胞环境的操控。物理仿真模拟 (Comsol) 计算结果显示这种交换在 30 s 内完全完成（图 55），可满足实时施加压力因子观测红细胞的变化可能性。

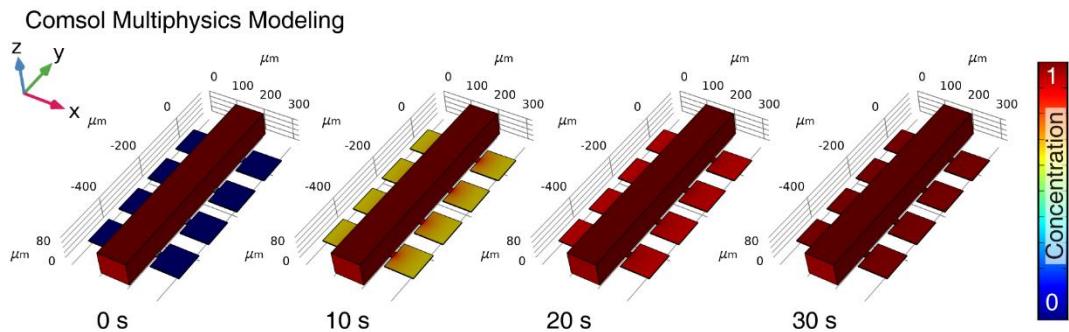


图 55. 物理仿真计算微流控芯片小室和主通道流体替换过程
Fig 55. Comsol simulation of the time evolution of buffer exchange on the microfluidic device.

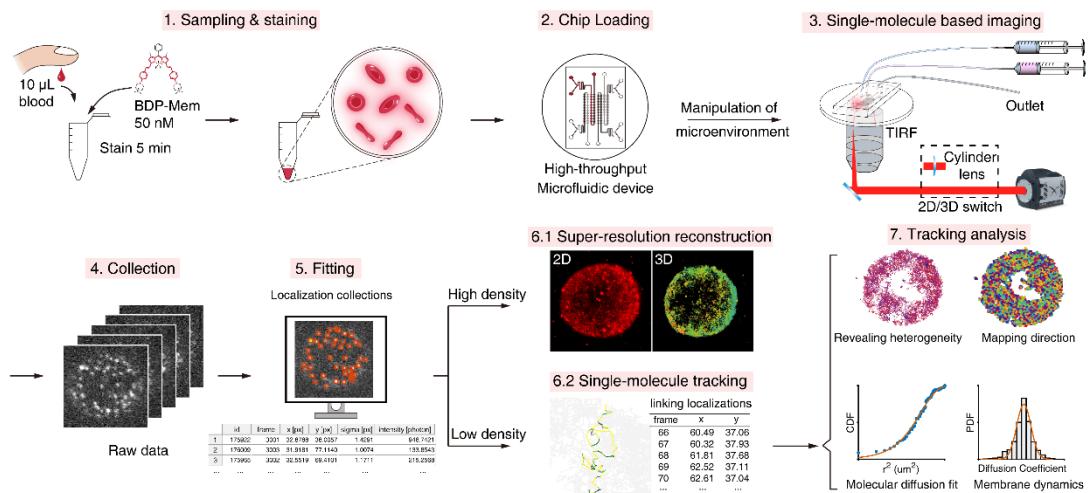


图 56. 通过样品制备、微流控系统搭建和多维度成像数据采集分析完成的活红细胞成像方法示意图

Fig 56. Schematic illustration of the developed approach for imaging live RBCs membranes through sample preparation, microfluidic system establishment and multidimensional computational data analysis.

至此，基于染料和微流控芯片的开发，已实现超分辨成像分子诊断活红细胞膜的可能。如图 56 所示，通过指尖采血 (10 μ L)，利用 BDP-Mem 对红细胞染色并通过离心洗涤掉多余染料，获取染色红细胞样本；加载红细胞到新键合芯片上，利用等离子体处理后芯片表面亲水吸附力，在小室内捕捉活红细胞；将芯片的入口出口恰当连接在注射器上，用注射泵维持主腔室的缓冲液，保证红细胞的活力，通过全内反射显微镜进行二维或三维超分辨成像；收集采样获取的数据，

通过单分子定位分析方法拟合数据，得到每帧单分子定位列表；将高密度数据直接用于叠加重构出红细胞膜二维或三维结构，而低密度数据通过前后连接算法，分析单分子在前后帧轨迹，获取红细胞膜表面微观力学特征。

4.5 活红细胞膜的多维度超分辨成像及力学分析

受益于建立的方法，通过芯片与 BDP-Mem 的融合成功在实验上解析了红细胞膜的超微结构和力学特征。首先，对活红细胞膜的二维超分辨成像结果如图 57a 所示，与同样细胞在传统荧光成像的照片（图 57b）以及传统白场成像照片（图 57c）相比，超分辨成像结果显示极高的清晰度提升。经由 BDP-Mem 染色后的红细胞膜表面并不均匀，存在许多染料聚集的点，这很可能说明膜表面的异质性。对超分辨成像的分辨率定量化，结果显示分子定位的平均定位精度在 23.2 nm（图 57d），整体的二维空间分辨率可达 68.5 nm（傅立叶环分析^[135,136]，图 57e）。而与商业化 DiD 染料相比，BDP-Mem 具有显著强化的单分子亮度（图 57f），并且在成像中展现了更好的持续性（图 57g）。

通过切换到三维成像设置，首次在实验上实现对活红细胞膜表面凹型特征结构观测。典型的三维重构结果可见图 57h，它通过对每个定位的颜色附加其轴向（Z 轴）位置信息，反映出红细胞膜的凹形结构特征，而相应的三维结果难以在传统荧光成像（图 57i）和白场成像（图 57j）中展现。为更清晰解析红细胞膜的三维结构，以红细胞中心为圆心制作了扇形剖面图（图 57k）。通过剖面图可以观察到红细胞膜向内侧隆起的结构特征。此外，在边缘位置红细胞膜也出现剧烈向上隆起特征，这与成像观察的或红细胞膜下表面特征不谋而合。如进一步对红细胞膜在不同焦面的定位进行重构分析（图 57l），随着焦面逐渐提升、远离盖玻片，可观察到红细胞膜明显从圆环上同时向红细胞中心和边缘扩散的特征，这也证实了活红细胞膜的凹型结构特点。

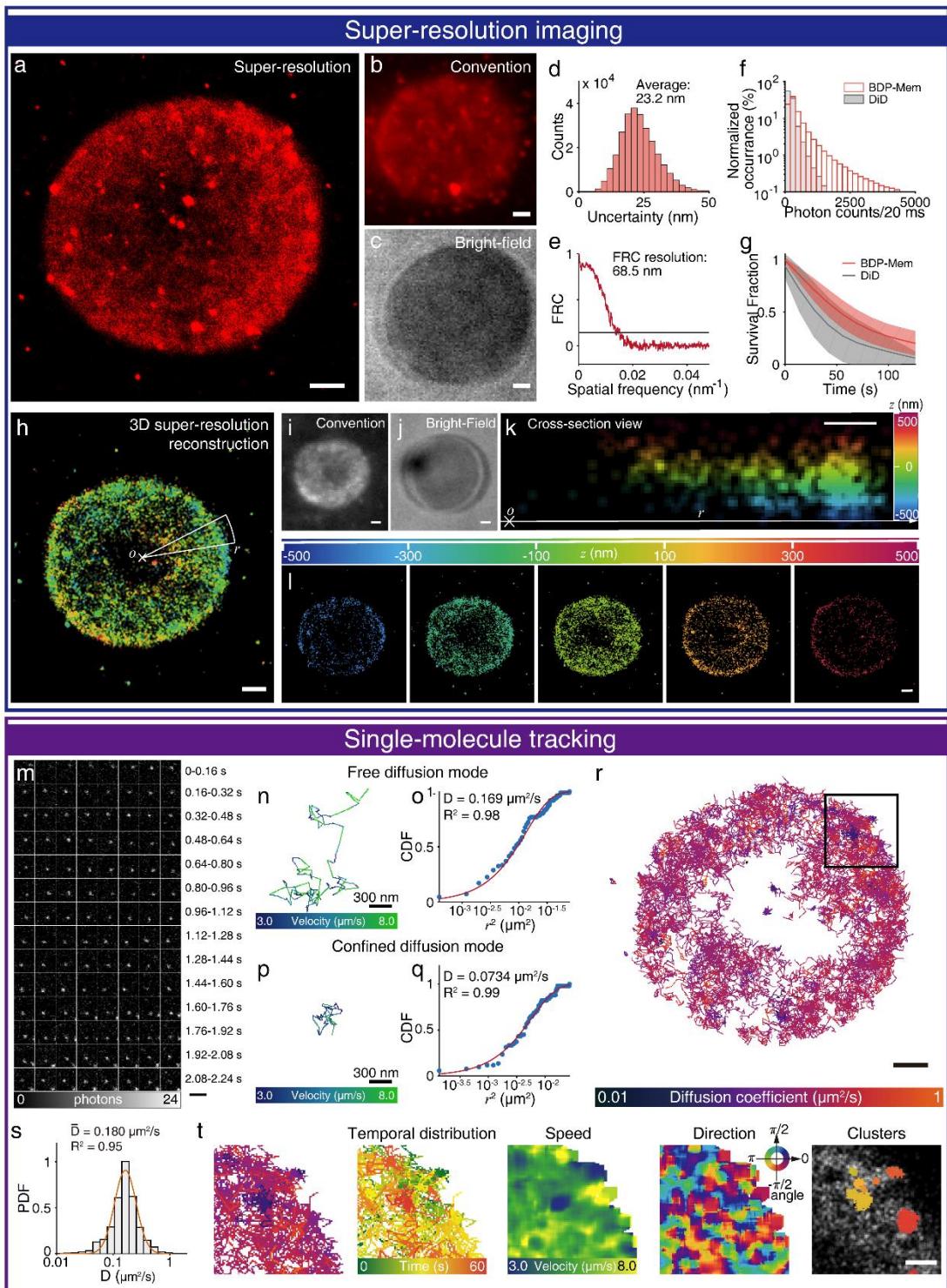


图 57. 通过融合策略实现对活红细胞膜的单分子尺度超微结构和动力学成像
 Fig 57. Imaging the ultrastructures and dynamics of living RBC membranes at the single-molecule level through the combinational approach.

(a) Localizations from BDP-Mem molecules reconstruct the membrane morphology of a red blood cell. The frame acquisition time is 20 ms. Conventional fluorescent (b) and bright-field (c) images of the same cell. (d) Histogram of localization uncertainties. (e) FRC analysis of the reconstruction. Comparison of single-molecule brightness (f) or survival fractions (g) between BDP-Mem and DiD ($n > 10$ RBCs) during super-resolution imaging. (h) 3D super-resolution reconstruction of a living RBC membrane. Colors are indexed according to axial positions. Conventional fluorescent (i) and bright-field (j) images of the same cell. (k) Cross-section view of the marked sector region in (h). (l) Serial Z-step 3D reconstructions. (m) Movement of a typical BDP-Mem molecule on the RBC membrane. (n,p) Magnified view of two typical molecular trajectories, with colors indexed by their velocities. (o,q) Cumulative distribution function (CDF) of the square displacements from trajectories (n) and (p). The CDF was fitted with a single exponential function. (r) Overlay of single-molecule tracking trajectories (over 10 steps) of BDP-Mem on the same membrane of (a). Colors are indexed by their diffusion coefficients. (s) PDF of the diffusion coefficients, fitted with a log-normal distribution. (t) Magnification of highlighted regions in (r). From left to right: magnification of overlaid trajectories, time-colored trajectories, velocity map, direction map and localization cluster analysis from the same region. Scale bars: 300 nm (n,p); 500 nm (t); 1 μm (a–c, h–l, r); 2 μm (m).

BDP-Mem 染料不仅可以提供定位以解析超微结构，同时它在膜表面还显示出长程的亮态持续时间特性（图 57m）。基于这种长亮态特征可以完成对染料在膜表面的单分子追踪。BDP-Mem 染料在活红细胞膜上展现出两种模式的运动特征，包括自由扩散型（图 57n、o）和受限型（图 57p、q），这两种类型的染料分子展现出截然不同的扩散系数 ($D = 0.169$ 或 $0.0734 \mu\text{m}^2/\text{s}$)。将分析获得所有单分子轨迹基于它们扩散系数对应颜色标注后进行叠加（图 57r），可观察到红细胞膜表面的明显扩散差异。尽管将所有的单分子轨迹扩散系数统计，可以分析出 BDP-Mem 染料在该红细胞膜的扩散系数 ($0.180 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ，图 57s)。对红细胞膜表面大约 $4 \mu\text{m}^2$ 局部（图 57t）放大分析显示膜表面具有异质性特点：染料在膜上运动无方向性限制，但超分辨成像重构结果的聚集分析指出几个分子定位密集区域，部分聚集区可对应单分子扩散轨迹的扩散限制区域，仍有少部分聚集区显示出非扩散限制特点。这些结果很可能揭示了膜表面由于蛋白、各类组分分布不均匀导致的异质性差异。

4.6 模型病态条件下活红细胞膜超微结构和动力学分析

基于标准红细胞膜分子诊断方法的建立,下面通过微流控芯片的微环境控制制造模型红细胞病态模型,以了解活红细胞膜在病态条件下的微观形貌和动力学特点。

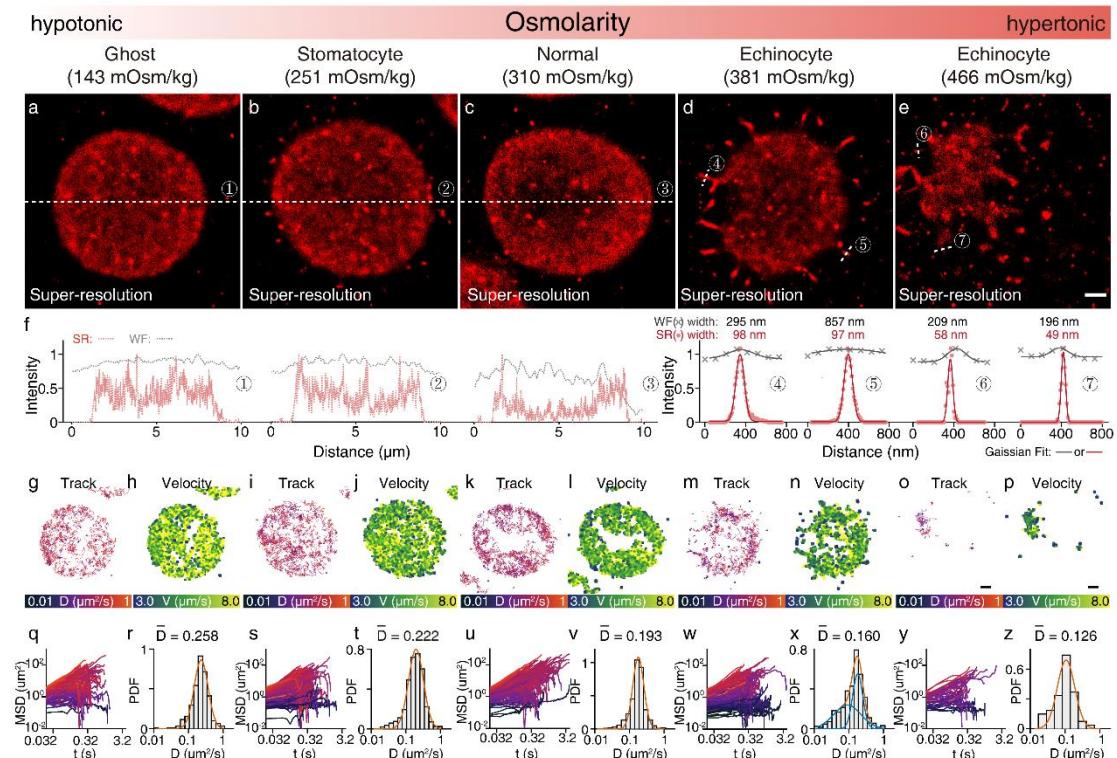


图 58. 渗透压条件下红细胞膜的单分子尺度超微结构和动力学成像

Fig 58. Ultrastructures and dynamics of RBC membranes under osmotic stresses.

(a–e) Super-resolution images of the membrane morphology from typical RBCs. (f) Comparison of the intensity profiles on the dashed lines highlighted in super-resolution (a–e). Single-molecule trajectory overlays (g, i, k, m, o), velocity maps (h, j, l, n, p), mean squared displacements (MSD) log plots (q, s, u, w, y) and diffusion coefficient (D) distributions (r, t, v, x, z) of BDP-Mem on RBC membranes. The frame acquisition time is 20 ms. Colors of MSD plots are indexed by diffusion coefficients, consistent with trajectory overlay images. Scale bars: 1 μ m.

渗透压是维持红细胞膜结构的至关重要因素^[137,138], 在各类疾病条件下(例如炎症情况下), 红细胞往往面对局部渗透压丧失或者过大的情况。因此, 利用 BDP-Mem 与芯片融合, 对活红细胞膜在低渗、等渗到高渗压力条件下进行了分子诊断(图 58)。从超分辨成像

重构结果可以观察到，在等渗 310 mOsm/kg 条件下，红细胞维持凹形结构特点（图 58c）；当渗透压降低到 251 mOsm/kg，细胞出现溶胀（图 58b），此时细胞的凹形结构逐渐丧失；渗透压进一步降低到 143 mOsm/kg，细胞出现破裂，形成均匀类似圆形的投影结构特点（图 58a）。这一过程也可以通过剖线强度分析获得（图 58f），在等渗时膜表面的分子信号出现在边缘聚集，中间减弱的情况，反映了凹形特点；当渗透压稍降低时，膜表面的分子信号不均匀特征有所减弱；而当膜破裂，形成红细胞“鬼影”时，剖线不再展现出边缘聚集特点，显示出红细胞完全破裂，形成均匀囊泡结构。当渗透压从平衡转向高渗时，红细胞膜表面会长出凸起（图 58d），这部分显然展现出 BDP-Mem 染料聚集的特点；当渗透压增加到 466 mOsm/kg，红细胞几乎完全破裂（图 58e），并且无“鬼影”产生。基于超分辨成像结果可测定高渗条件下红细胞膜的表面凸起空间尺寸在 49-98 nm，而传统成像只能给出远超实际值的测量结果 (> 190 nm)。

红细胞在不同渗透压下其膜表面流动性也展现出巨大的差异性（图 58g-z）。病态红细胞膜表面染料的单分子轨迹叠加图和速率图可参见图 58g-p，即便红细胞膜进入病态，其表面仍然出现一些限制扩散区域，反映出膜异质性在渗透压改变过程中仍然得以保持。为更准确分析 BDP-Mem 在病态红细胞膜上扩散特征，对每种红细胞上扩散轨迹的平均平方位移（mean square displacements, MSD）在时间轴上进行了统计，结果如图 58q、s、u、w、y 所示。在低渗和渗透压平衡条件下，红细胞膜上染料分子主要展现出具有大斜率 MSD 特征的快速扩散过程；而对于高渗情况下，一大部分的染料分子扩散出现明显的限制，其 MSD 斜率明显偏低。基于这种差异性，渗透压条件下红细胞膜的整体平均流动性也有明显的差异（图 58r、t、v、x、z），随着渗透压的降低，红细胞膜表面平均扩散系数从 $0.193 \mu\text{m}^2/\text{s}$ 提升至 $0.258 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ；而随着渗透压从平衡转向高渗情况，红细胞膜表面平均扩散系数也将降低至 $0.126 \mu\text{m}^2/\text{s}$ 。渗透压改变条件下，红细胞膜同时出现流动性和超微结构的转变，利用这些差异性，可对病态条件进行诊断分析。

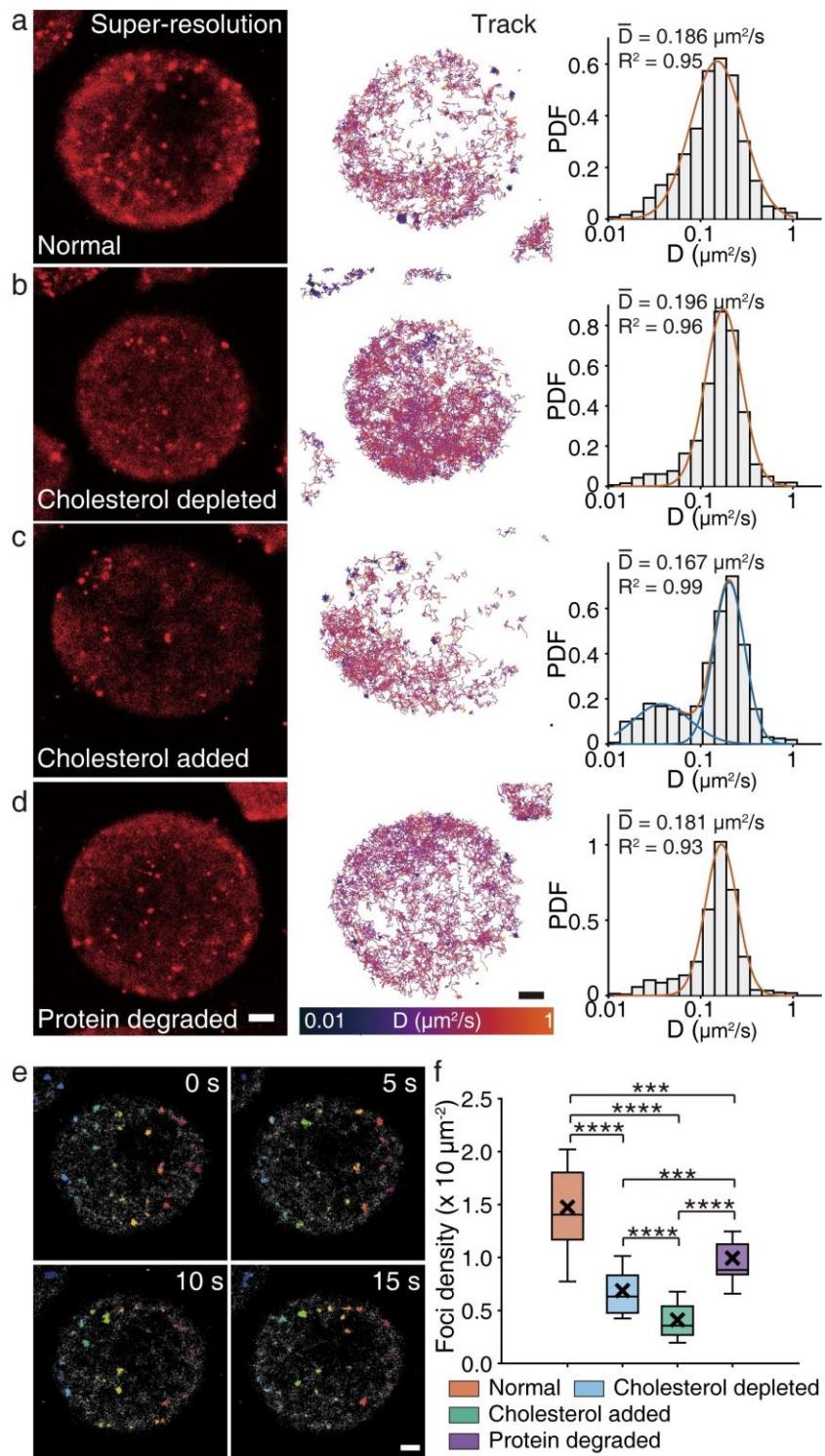


图 59. 活红细胞非常态膜的研究

Fig 59. Studying disordered membranes of living RBCs.

(a-d) From left to right demonstrates the super-resolution reconstructions, overlaid

single-molecule trajectories and diffusion coefficient distributions on the RBC membranes at specified disordered states. (e) Dynamic reconstructions of living RBC membranes at normal state. The foci colors indicate the different localization clusters. (f) Box plots of foci density on RBC membranes: whiskers indicate 10, 25, 50, 75, 90 data percentiles and the crosses indicate the average data. Significance was determined through a two- sample t-test with $p<0.001$, ***; <0.0001 , **** ($n\geq 17$ RBCs). Scale bars: 1 μm .

在病理状态下，红细胞膜可能会出现无序化，从而扰乱其功能。基于现代关于膜液液相分离的模型^[139]，红细胞膜很可能在时空中出现液相有序和无序相随机分布特征。为诊断这种膜时空异质性变化，构建了无序状态红细胞膜，并利用 BDP-Mem 染色对膜超微结构和动力学进行成像研究（图 59）。

在膜的多种组分中，胆固醇对膜液相有序和无序相具有至关重要影响，过去对于人造囊泡体外的研究^[140]表明，胆固醇混合比例决定了囊泡的相状态。基于这个认知，利用甲基环糊精对胆固醇的亲和作用力，构建了胆固醇含量异化的非常态红细胞膜。与渗透压改变条件下膜的巨大形貌差异不同，红细胞膜在非常态下展现出结构相对完整性，其超分辨成像结果并未揭示差异化的形貌（图 59a-d）。但相较于正常红细胞膜流动性（图 59a, $\bar{D} = 0.186 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ），膜上胆固醇含量减少时，膜无序比例增加，染料在膜上平均扩散系数略微大（ $0.196 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ）；当胆固醇增加时，膜有序相比例增加，染料在膜上的平均扩散系数略微小（ $0.167 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ）；当膜上的蛋白被随机降解后，膜的流动性特征几乎保持不变（ $\bar{D} = 0.181 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ）。

通过简单形貌学和流动性特征似乎无法区分红细胞膜以上的差异化状态，为此对红细胞膜表面超微结构细节进行了研究。在膜表面，染料会在时空中出现聚集特点，这些位置往往在反映出流动性的局限性，很可能与膜的无序相有序相相互转换相关。聚集位点时空分析（图 59e, 图 60a）显示，这些聚集点随机的分布在膜表面，并且不展现出在时间轴上连续性。基于对膜非常态的成像数据解析，三种非正常的膜展现出聚集点的密度差异（图 59f），在胆固醇含量变化与膜表面蛋白降解的情况下，膜聚集点密度均出现了大幅度的减少（ $15 \mu\text{m}^{-2}$ 正常 vs $6.9 \mu\text{m}^{-2}$ 胆固醇清除 vs $4.1 \mu\text{m}^{-2}$ 胆固醇增加 vs $9.9 \mu\text{m}^{-2}$ 蛋白降解）。在非常态膜条件下，聚集点的大小、圆形度没有出现明显差

异(图60b、c);当胆固醇含量增加,膜有序性变强时,构成聚集区域的定位点密度有少许增加(图60d)。这些结果很可能说明染料的聚集,反映了膜的有序无序正常转换过程;这种膜表面超微染料聚集结构分析,可用来揭示膜病态差异化不同,成为未来诊断可能的标准。

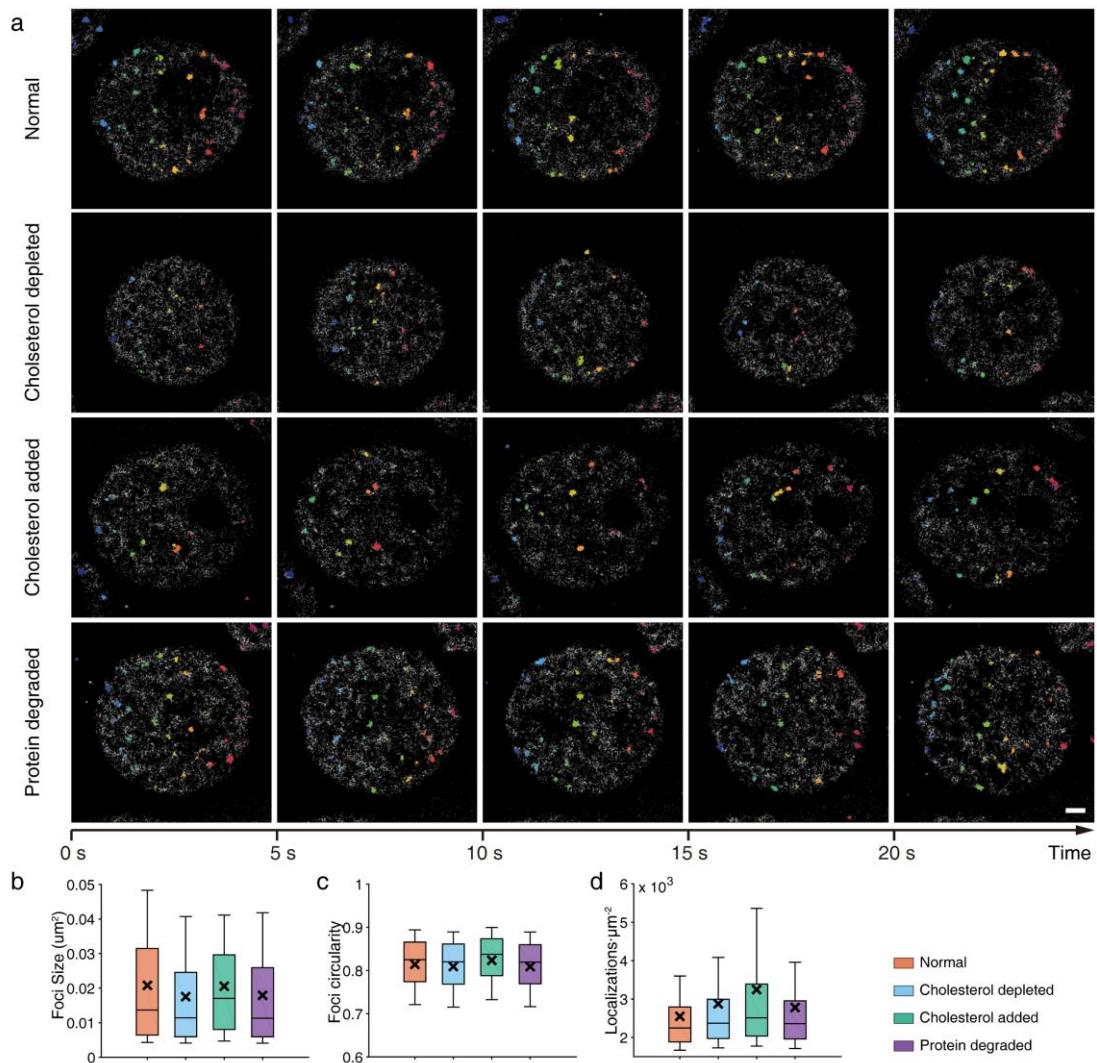


图60. 活红细胞非常态膜的染料聚集点研究

Fig 60. Foci study on disordered membranes of living RBCs.

(a) Localizations from BDP-Mem form clusters dynamically on the membranes. The colors are used to distinguish different foci. Box plots of foci sizes (b), circularity (c) and localizations density (d): whiskers indicate 10, 25, 50, 75, 90 data percentiles and the crosses indicate the average data from $n \geq 17$ RBCs. Scale bar: 1 μm .

为了更进一步说明分子诊断的可行性,避免单一红细胞研究带来

的测定结果误差,基于相似的分子诊断方法对大量的病态模型红细胞完成了分析(附录A)。结果显示,渗透压变化条件下,红细胞膜不仅仅表现出差异化的超微形貌特征,其膜表面流动性也随着渗透压不同而改变(图61):低渗条件时,膜展现出溶胀特点,由于细胞整体内容物体积增大,因而膜表面变得疏松而出现流动性增强特点;高渗条件时,膜剧烈收缩,形成凸起,同时表面流动性因为膜变得致密而减少。在Pb²⁺刺激病态条件下,膜出现收缩,形成凸起,但其流动性特征并未明显变化。在非常态膜条件下,膜整体形貌和流动性特征不一定出现显著差异,但其表面染料聚集结构出现密度显著性差异,可用于指征膜状态的改变。

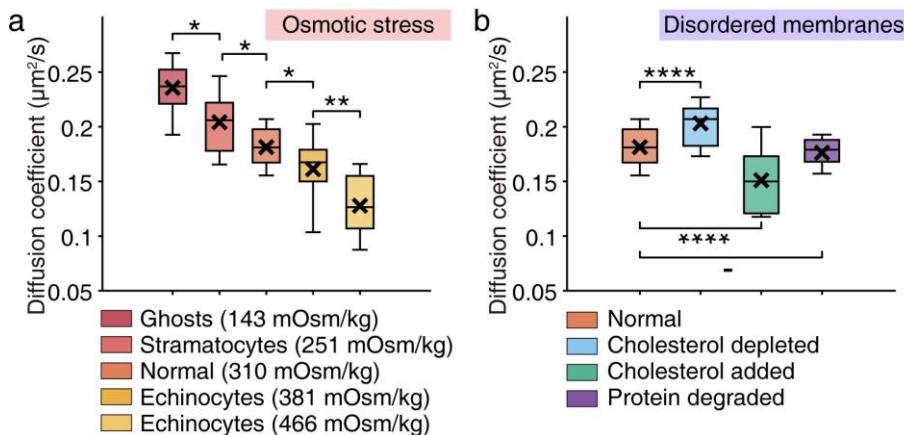


图61. 对BDP-Mem染料在病态模型红细胞膜表面扩散特性的比较研究
Fig 61. Comparison of the diffusion coefficients of BDP-Mem on the RBC membranes under osmotic stress and disordered conditions.

The boxplot elements are defined as following: center line, median; box limits, upper and lower quartiles; whiskers, the 10th percentile and the 90th percentile.

Significance was determined through a two-sample t-test with -, ns; $p < 0.05$, *; < 0.01 , **; $p < 0.001$, ***; < 0.0001 , ****.

4.7 总结

通过对氟硼吡咯分子设计,发展一种远红发光膜探针BDP-Mem。新染料具有对红细胞膜的染色能力,并且在单分子尺度上同时展现出亮暗态光闪烁和持续亮态特征,满足单分子定位和追踪需求,适用于对红细胞超分辨成像诊断分析。另外,针对红细胞悬浮移动特点,开发了一种微流控芯片,通过捕获和物理限制红细胞,使得成像得以在

全内反射显微镜内完成，极大程度提升单分子信号信噪比；芯片提供了对红细胞微环境操控功能，可灵活发展疾病模型红细胞。

染料和芯片融合实现了对活红细胞膜的超微结构分析，其三维结构成像以超高分辨率首次展示了活红细胞膜的凹形结构特征；通过高通量疾病模型红细胞膜的形貌和动力学特征诊断，揭示了在渗透压改变和膜组成变化的基础膜病态情况下，红细胞膜的特征超微结构和流动性特征。该红细胞膜分子诊断技术开发，重新定义了对红细胞膜的诊断分析精确度边界，将推动超分辨成像技术在医学生命科学诊断方向应用。

5 光激活亚硝基笼化罗丹明生物正交标记策略开发

5.1 前言—光激活策略在超分辨成像上的问题

单分子定位超分辨成像需要荧光染料在单分子尺度上稀疏发光，而满足这种要求的染料很少。一种有效满足发光稀疏化的分子设计策略是笼化，通过对荧光团母体进行光敏感性修饰，使得染料本身进入隐色体状态，而失去可见光区吸收和荧光发射；当染料被相应激活光（或者其它激活因子）照射后，随机通过光化学反应转换到具有可见光吸收和荧光特征的结构，从而恢复荧光。通过操控激发光强，可实现染料从暗态到亮态的可控光切换，其激活事件具有随机性，但激活发生的程度可通过光强约束，可获取超分辨成像所需的单分子稀疏性。这种基于分子设计实现超分辨成像的方式备受研究者青睐，从宽泛的角度而言，自闪烁正是一种“自身激活”获取超分辨成像的分子设计策略。

由于罗丹明染料的高亮度和稳定性特征，这类染料常通过笼化设计用于超分辨成像^[141]。传统上，邻硝基苄基笼化罗丹明咕吨环 2, 7 位供体氨基修饰，通过吸电子诱导效应，抑制罗丹明平面形式亮态，从而实现光激活罗丹明染料设计。为了简化传统笼化两步光激活反应，Johnsson 团队^[142]对罗丹明 110 单边笼化修饰，并通过另一侧供体氨基连接 SNAP 蛋白标签底物实现对线粒体超分辨成像。Lavis 团队^[143]发展了笼化罗丹明的合成策略，通过他们发展的笼化罗丹明鬼笔环肽染料实现对肌动蛋白 (F-Actin) 的超分辨成像。Belov、Wurm 和 Hell 团队^[144]共同发展了叠氮笼化策略，超越传统供体氨基取代基修饰策略，他们发展的叠氮笼化取代了螺环亲核基团。近期，Hell 团队^[79]在罗丹明咕吨环 4 位置取代烯烃，发展了一类无光激活副产物的新笼化策略，他们基于该策略开发一系列染料命名为 PaX 染料。通过 PaX 染料，他们实现了对细胞核孔的超高分辨率解析。

然而，上述的笼化策略均需要通过紫外或者近紫外光完成激活。紫外或近紫外光由于较大的能量以及组织吸收率，会对细胞尤其是活细胞成像产生较大的光毒性^[145]以及背景干扰，因而不适用于活细胞超分辨成像。直到目前位置，可见光激活的超分辨成像探针仍然十分罕有。

5.2 可见光激活亚硝基笼化染料分子设计

近期，本人博士研究工作发现亚硝基笼化罗丹明（nitroso-caged rhodamine, NOR）染料^[146,147]具有适用于超分辨成像的光激活特性。当时研究证实了这类染料的紫外光激活特性，通过对活细胞线粒体染色，可实现对线粒体动态超分辨成像。然而，一个被忽视的事实是亚硝基笼化 N-NO 键键能（43 kJ/mol）^[148,149]显著低于一般的 C-N 或 C-O 键，这意味着这类笼化基团可能因可见光（532 nm）激发而离去。综上，亚硝胺笼化罗丹明可能是罕有的可见光激活超分辨成像笼化染料。

然而，对亚硝基笼化分子发展标记却十分困难。Xiao、Yang 团队^[146]协作发展了对溶酶体标记的吗啉亚硝基罗丹明，然而这种染料的开发却要求重头设计和合成。这无疑限制了亚硝基笼化罗丹明的应用空间。解决该问题的关键是生物正交标记策略，它利用四嗪-环辛炔/环辛烯的特异 Diels-Alder 环加成反应^[38,150]在生物体内完成标记，而在染料设计上将双底物各自连接到功能分子上，实现标记功能和荧光功能的分离。基于该策略，可实现笼化染料一次开发，通过正交底物标记配体，实现对不同组分成像。另外一种生物共价连接修饰策略是为荧光团修饰具有化学反应活性，尤其是氨基反应活性（生物大分子上往往具有伯氨基）的取代基，从而实现对多种生物大分子标记和开发。

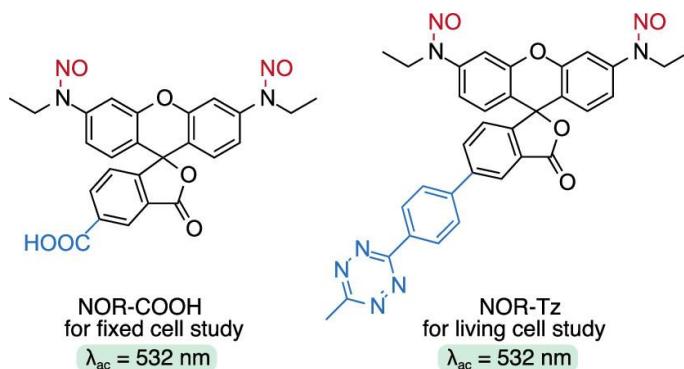


图 62. 罗丹明染料亚硝基笼化策略

Fig 62. Nitroso-caged strategy for rhodamine fluorophores.

如图 62 所示，郑莹博士经由上述分子设计，合成了 NOR-COOH

和 NOR-Tz 两种染料。这两种染料分别具有活性羧基（标记生物大分子活泼氨基）和四嗪，可用于固定细胞和活细胞生物正交标记成像。相关的合成细节可参见郑莹博士论文。

5.3 亚硝基笼化罗丹明光谱性质研究

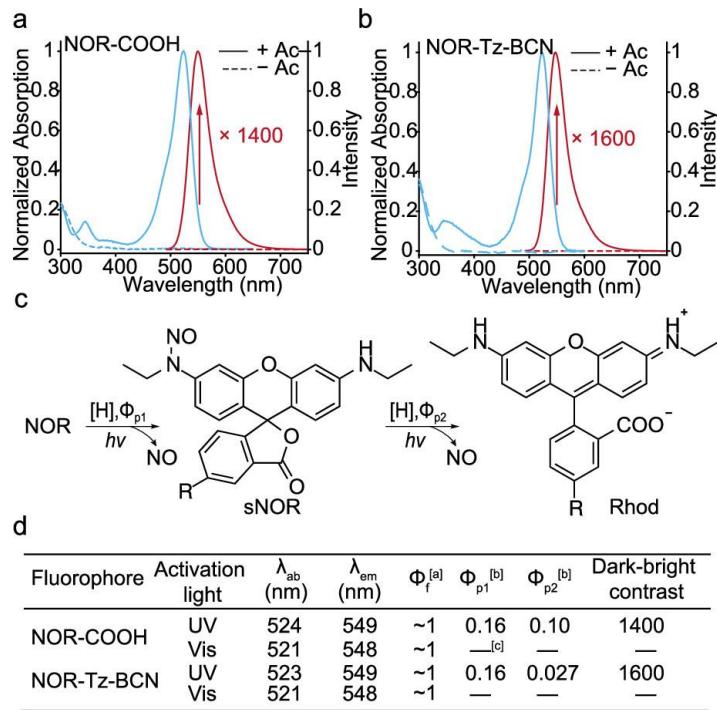


图 63. 亚硝基笼化罗丹明染料光谱性质

Fig 63. Spectral properties of NORs.

Spectra of NOR-COOH (a) or NOR-Tz-BCN (b) in PBS solution (pH = 7.4, containing 10 or 50% v/v methanol) before and after photoactivation under UV light.

Absorption and fluorescence spectra are colored in blue and red, respectively. (c)

Proposed photo-uncaging process of NOR-COOH and NOR-Tz-BCN. (d)

Summarized spectroscopic properties of the uncaged NOR probes.

为确定新染料的成像性能，首先对它们进行了光谱性质研究。如图 63a-b 所示，NOR-COOH 和 NOR-Tz-BCN (NOR-Tz 与环辛炔反应连接后形成的复合物) 在光激活前后展现了从无到有的可见光吸收和发射变化，激活后亮态荧光比激活前 > 1000 倍。图 63c 展示亚硝基笼化染料可能的光激活过程：在紫外激活光照明下，染料的激发态与周围氢质子作用，以 Φ_{p1} 量子效率转换脱去一个一氧化氮分子形成单边保护的 sNOR，而这个中间体在质子环境与紫外光协同作用下，

以 Φ_{p2} 量子效率脱去另一个一氧化氮，从而形成罗丹明 6G 类似发射母体，恢复可见光的吸收和发射。对 NOR 的光激活实验表明光激活两步具有不同的量子效率：对于所有分析 NOR，它们的第一步量子效率均为 0.16；而第二步激活，由于四嗪或四嗪与环辛炔反应后产物的 N 原子的孤对 p 电子可能发生光激活电子转移过程，猝灭染料激发态，NOR-Tz-BCN 具有比 NOR-COOH 显著降低的 Φ_{p2} (0.024 vs 0.10)。图 63d 列出了 NOR 的光谱性质结果，NOR 染料由于激活后产生了类似罗丹明 6G 染料，其荧光量子效率接近于~1，具有很好的亮度，适用于单分子定位超分辨成像。

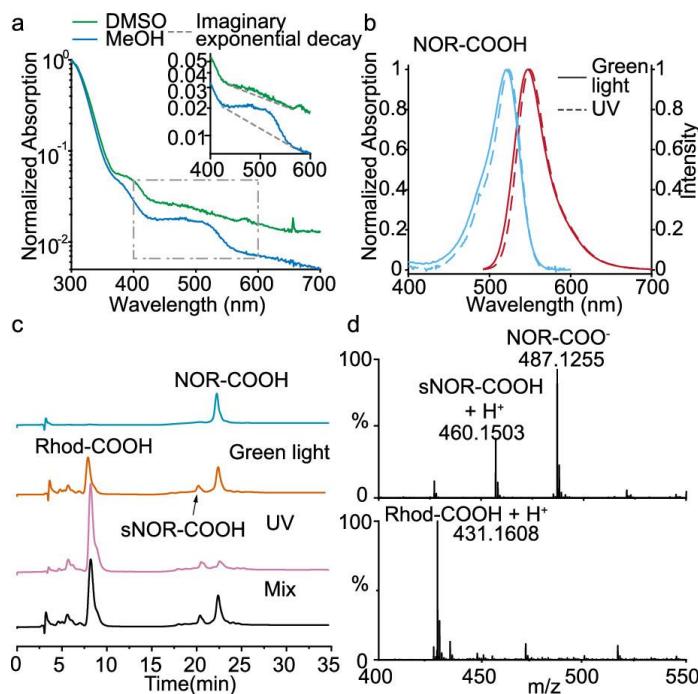


图 64. 亚硝基笼化罗丹明染料的绿色可见光激活特性

Fig 64. Green light-photoactivated NOR.

(a) Absorption spectra of NOR-COOH at 100 μ M in methanol or dimethyl sulfoxide. The inset shows the magnified spectra of the highlighted region. (b) Spectral comparison of photoproducts from NOR-COOH in PBS solution (pH = 7.4, containing 10% v/v methanol) through green light and UV light photoactivation. Absorption and fluorescent spectra are colored in blue and red, respectively. (c) HPLC analysis of NOR-COOH or its uncaged products under UV light or green light irradiation (“Mix” represents a sample, which is a mixture of two samples subjected to UV light and green light). (d) High-resolution mass spectrometry of NOR-COOH (top row) and its green light photoproducts (t_R = 7 min, bottom row).

那么可见光是否能够激活亚硝基笼化罗丹明呢？为了探寻这一点，对典型的亚硝基笼化罗丹明 NOR-COOH 在不同溶剂中吸收光谱进行了测量。如图 64a 所示，在二甲基亚砜和甲醇溶剂中，NOR-COOH 在可见光区（包括 532 nm）展现出尾吸收，这个吸收很可能与 N-NO 的 p 轨道到分子 π 轨道跃迁有关。在可见光照明实验条件下，NOR-COOH 也可以被激活，光激活产物的光谱与紫外光激活一致（图 64b，图 63d）。为了确证可见光激活与紫外光激活产物一致性，对光激活产物进行了色谱和质谱研究。如图 64c 所示，不管是可见光还是紫外光，均转换出保留时间 (t_R) 为 7 min 的光激活产物，并且两种激活混合液液相也显示出单一激活产物特征。更进一步，收集保留时间 $t_R = 7$ min 的产物，通过高分辨质谱可确认该产物即为两个亚硝基脱笼化的罗丹明 6G 类似物 Rhod-COOH（图 64d）。这些结果毫无疑问证实了 NOR 可以被可见光激活，其激活产物与紫外光一致。基于 NOR 光激活产物 Rhod 可被可见光激发的情况，利用 NOR 很可能可以实现单一光源同时激活与激发的光激活超分辨成像。

5.4 亚硝基笼化罗丹明单分子光物理性质研究

受亚硝基笼化罗丹明可见光激活特性鼓舞，下面对这类染料的单分子光物理性质进行了研究。为了准确获知 NOR 染料在生物大分子界面环境上的荧光性质，NOR-COOH 被标记在抗体蛋白分子上。通过保证染料蛋白标记比低于 0.3，使得绝大多数标记的抗体蛋白保持单标记，从而实现对 NOR 的单分子分析。基于 NOR 的可见光激活能力，单分子研究采用了单一的 532 nm 绿色激光光源，该条件可同时激活 NOR 并激发 NOR 激活后产物，可以最大程度分析 NOR 的单分子光物理性质。典型的单分子荧光轨迹曲线如图 65a 所示，NOR 分子随机在时空中被可见光激活，然后爆发出几次亮暗态转换的闪烁过程。为了精确测定 NOR 单分子光物理性质，统计了染料单分子荧光事件的时间概率密度分布 (probability density function, PDF, 图 65b)，并使用驻留时间一次事件的泊松分布拟合该分布 ($PDF(x) = e^{-x/t}/t$, $R^2 > 0.95$)。通过分析，可以准确测量 NOR 的单分子激活 (k_{ac})、亮态转换到暗态 (k_d)、暗态转换到亮态 (k_r) 和光漂白 (k_b) 事件发生的速率。亚硝基笼化罗丹明染料的单分子光物理性质总结列

在图 65c 中, 随着激活光强的增强, NOR 的激活速率也等比例增强 ($k_{ac} = 0.85 - 2.17 \text{ s}^{-1}$), 相应的 k_d 、 k_b 也变大, 同时在光强达到最大值时 (2.0 kW/cm^2), NOR 展现出最佳的单分子亮度 (982 photons)。但随着激活光强增强, k_r 却没有出现明显变化, 这说明染料在激活后进入的暗态独立于激活激发光影响。染料在更高的光强下展现出更大的 k_d/k_r , 更大比例的染料处于暗态, 而具有更好的单分子荧光稀疏度; 同时, 在更高光强下, NOR 染料单分子亮度更高。这些结果说明 NOR 应当适用于 2.0 kW/cm^2 照明条件下的单分子定位超分辨成像。

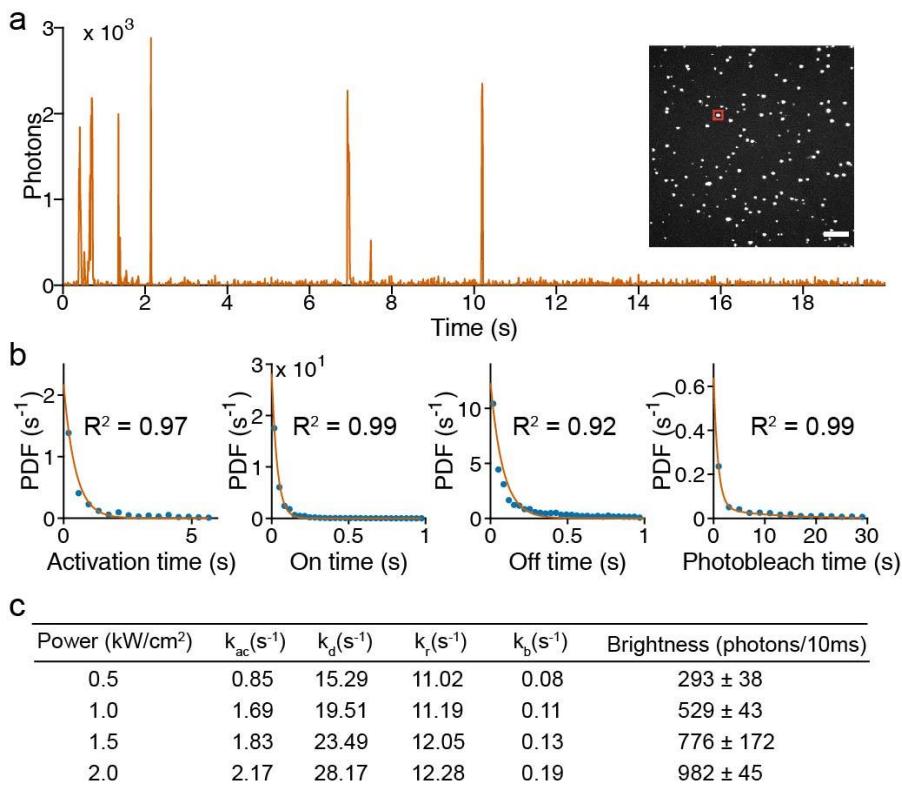


图 65. 亚硝基笼化罗丹明染料的单分子光物理性质研究

Fig 65. Single-molecule photophysical study of NOR.

(a) Typical fluorescence trajectory of a NOR molecule under continuous irradiation of a 532 nm laser (2.0 kW/cm^2). The inset shows the max projection of recorded fluorescence stack images. The red box highlights the molecular signal corresponding to the trajectory (a). (b) Probability density function (PDF) of activation time, on time, off time, and photobleach time of the NOR at the 2.0 kW/cm^2 condition fitted to single or double exponential functions. (c) Summarized key photophysical properties of the NOR under a series of laser powers. Scale bar: $5 \mu\text{m}$.

5.5 生物正交标记超分辨成像

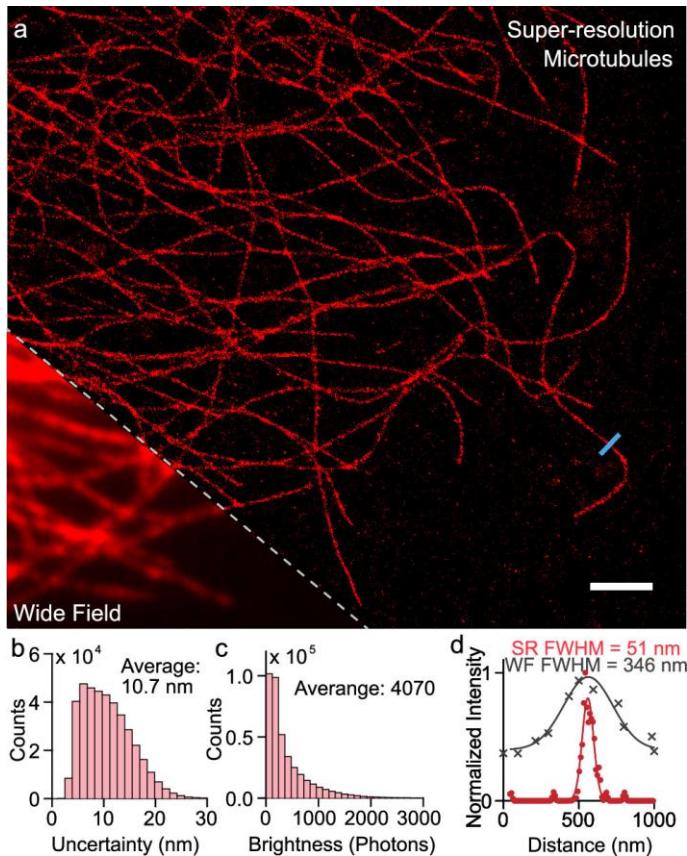


图 66. 亚硝基笼化罗丹明染料对固定细胞微管超分辨成像

Fig 66. Super-resolution imaging of microtubules with NOR in a fixed HeLa cell.

(a) Super-resolution image of microtubules immunolabeled with a primary antibody against α -tubulin and a secondary antibody labeled with NOR-COOH. A conventional image is overlaid at the bottom. Histogram of localization uncertainties (b) and single-molecule brightness (c) of the reconstruction. (d) Intensity profiles of microtubule filaments highlighted with blue lines in the super-resolution image (a). Scale bar: 2 μ m.

得益于亚硝基笼化罗丹明染料可见光激活特性及良好的单分子光物理性质,下面探索这一系染料超分辨成像性能。首先,利用 NOR-COOH 对生物大分子标记功能,对固定细胞微管进行抗体标记成像。由于 NOR 本身的可见光激活特点,成像仅采用了单独的 532 nm 激光同时作为激活光和激发光,并且在普通 PBS 缓冲液中完成了成像。图 66a 展示了超分辨成像的结果,相较于传统荧光成像,超分辨成像显示出显著的清晰度提升,解析了微管的扭曲、交错结构特征。超分

辨成像定位的精确度估计在 10.7 nm (图 66b)，而对应于 NOR 染料单分子事件平均亮度在 4070 photons/50 ms (图 66c)。经由超分辨成像和传统成像测量的微管结构尺度显示出巨大差异，超分辨成像显示出经过一二抗标记后扩大的微管尺度在 51 nm，而宽场荧光成像测量结果在 346 nm (图 66d)。这些结果显示 NOR 可以有效对生物大分子标记，并且在免成像液和单一激活激发光源条件下，可以实现对固定细胞微管的清晰解析。

为进一步探索亚硝基笼化罗丹明的成像潜力，基于四嗪-环辛炔生物正交标记体系，利用 NOR-Tz 实现对活细胞代谢物的追踪标记和成像 (图 67)。图 67a 展示了这种正交标记策略的实施方法，将细胞培养和喂食环辛炔连接的甘露糖胺 (BCN-Ac₄ManN)，使得标记底物通过细胞代谢分布到甘露糖存在位点，然后将 NOR-Tz 染料标记到这种表达有环辛炔聚糖的细胞；通过四嗪-环辛炔生物正交反应，染料得以共价连接到标记底物聚糖上；最后将多余未标记染料洗涤，即可进行荧光成像解析标记结果。

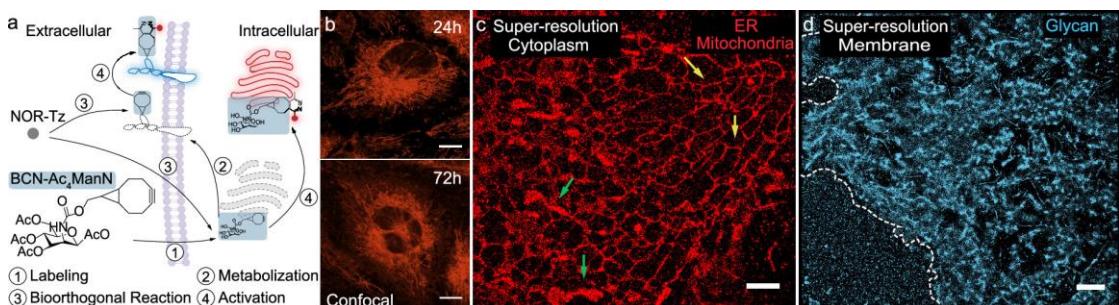


图 67. 亚硝基笼化罗丹明染料通过生物正交标记超分辨成像细胞代谢物聚糖

Fig 67. Super-resolution imaging of glycans with NOR through bioorthogonal strategy in living cells.

(a) Labeling of glycans was achieved by the MOE technique with BCN-Ac₄ManN and NOR-Tz. (b) Confocal fluorescent imaging of glycans/unnatural mannosamines in live HeLa cells. Super-resolution imaging of cytoplasm (c) and plasma membrane (d) in living HeLa cells. The green arrows mark the mitochondria, whereas yellow arrows indicate the endoplasmic reticulum. The acquisitions were conducted at 100 Hz. Scale bars: 10 (b); 2 (c); and 4 μ m (d).

值得注意一点是随着细胞代谢标记糖时间的不同，被利用甘露糖的分布也出现了时空差异。如图 67b 所示，当喂食细胞时间在 24 h 时，甘露糖及其形成聚糖主要分布在线粒体上；而当喂食时间延长到

72 h 时, 甘露糖出现了明显的细胞膜及内质网分布。基于上述结果, 对细胞内和细胞膜表面的标记甘露糖分别进行了超分辨成像。细胞内基质中甘露糖主要分布在线粒体 (绿色箭头, 图 67c) 和内质网 (黄色箭头) 上; 而在细胞膜上, 甘露糖出现了均匀的分布特征(图 67d)。这些结果反映出在细胞内存在甘露糖加工到细胞膜表面聚糖的分子工程。

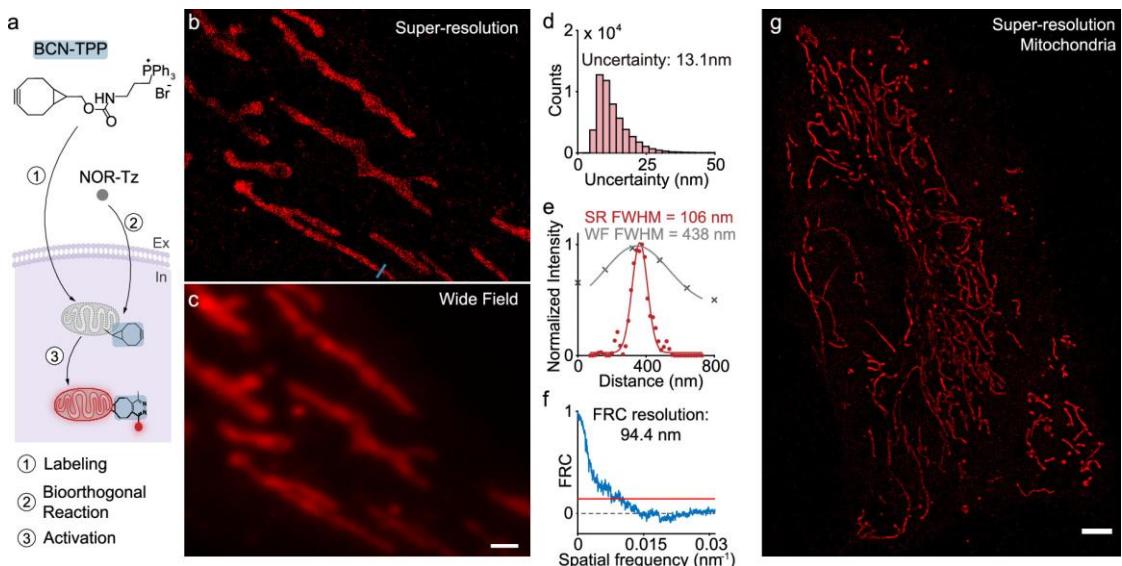


图 68. 亚硝基笼化罗丹明染料通过生物正交标记超分辨成像线粒体

Fig 68. Super-resolution imaging of mitochondria with NOR through bioorthogonal strategy.

(a) Mitochondria labeling was realized through bioorthogonal reaction with BCN-TPP and NOR-Tz. Extracellular is abbreviated as Ex and intracellular is abbreviated as In. Super-resolution image (b) and convention image (c) of mitochondria in a live HeLa cell. The acquisition was conducted at 200 Hz. (d) Histogram of localization uncertainties. (e) Intensity profiles of mitochondria highlighted with blue lines. (f) FRC analysis of the super-resolution image (b). (g) Super-resolution image of mitochondria in an entire live HeLa cell. The acquisition was conducted at 100 Hz. Scale bars: 2 (c) and 4 μm (g).

基于相似的生物正交标记还可以将 NOR 以小分子染色方式对亚细胞器进行成像。比如, 利用环辛炔连接的三苯基膦 (BCN-TPP) 可以对线粒体内脊进行特异性标记, 然后利用 NOR-Tz 实现桥连和最终的线粒体成像 (图 68a)。基于这种方式, 在 NOR-Tz 染色条件下, 成功对活细胞线粒体实现了超分辨成像 (图 68b), 其成像的时间分辨

率在 5 s，显示出相较于传统荧光成像更好的分辨率（图 68c）。该成像的定位精确度在 13.1 nm（图 68d），同时超分辨成像揭示了 106 nm 宽度的线粒体尺寸，比宽场荧光成像估计的 438 nm 更为准确（图 68e）。整体成像的空间分辨率可通过傅立叶环分析估计，大约为 94.4 nm（图 68f）。不仅如此，基于上述策略，NOR-Tz 还可以对全细胞的线粒体进行超分辨成像（图 68g）。

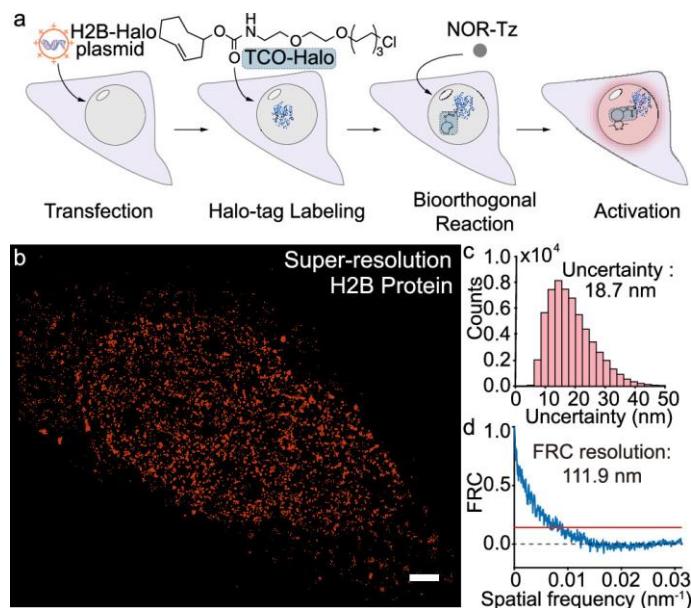


图 69. 亚硝基笼化罗丹明染料通过 Halo 蛋白标签策略超分辨成像细胞核组蛋白
Fig 69. Super-resolution imaging of H2B proteins with NOR through the HaloTag technology.

(a) Labeling H2B fusion proteins through a two-step approach with NOR-Tz. (b) Reconstructed image of H2B-Halo fusion proteins in a live HeLa cell. Histogram of localization uncertainties (c) and FRC analysis (d) of (b). Scale bar: 2 μm .

基于类似的正交标记桥连方法，NOR 可以实现对蛋白标记成像。图 69a 展示了该策略标记过程，首先标记环辛炔连接的蛋白标签底物（TCO-Halo）染色 H2B-Halo 融合蛋白质粒转染细胞；待 TCO-Halo 标记到 Halo 蛋白上，洗去多余的标记物，使用 NOR-Tz 染色对应细胞；NOR-Tz 通过生物正交标记反应桥接到 Halo 蛋白上，洗去未标记的染料，最后成像。细胞核 H2B 蛋白的超分辨成像结果可见图 69b，成像揭示了 H2B 组蛋白在细胞内的分布特征。成像的定位精度在 18.7 nm（图 68），而对应的整体分辨率估计在 111.9 nm（图 68d）。

5.6 总结

亚硝基笼化罗丹明显示出可见光激活特性,这一独特性使得染料可以在同一波长激光 (532 nm, 绿色激光) 下, 实现同时的激活和激发, 以及单分子定位超分辨成像。为了实现生物正交标记, 为亚硝基笼化罗丹明修饰了具有化学反应活性的羧基和四嗪基团。通过生物正交标记策略, 亚硝基笼化罗丹明成功对固定细胞微管、活细胞代谢物 (甘露糖)、亚细胞器 (线粒体) 以及蛋白 (细胞核组蛋白) 进行了超分辨成像。尤其值得注意的是, 成像在非成像液体体系中, 使用单一光源同时激活与激发染料实现, 其成像分辨率 (微管, 10.7 nm 定位精度和估计的 51 nm 微管尺寸) 可达到领域内顶尖水平。

6 超越背景屏障的多维度溶酶体超分辨成像

6.1 前言—三维单分子定位的问题

二维到三维的里程碑式跨越革命性提升了超分辨成像的真实性，它将传统成像的二维 x、y 投影变成真实时空中的三维 x、y、z 结构，为解决生命和材料科学中的现实问题提供了精准的成像工具。然而，高信噪比单分子信号的缺失，已成为制约三维单分子定位超分辨成像发展和应用的瓶颈，尤其对于活细胞等非成像液适用体系的成像需求。

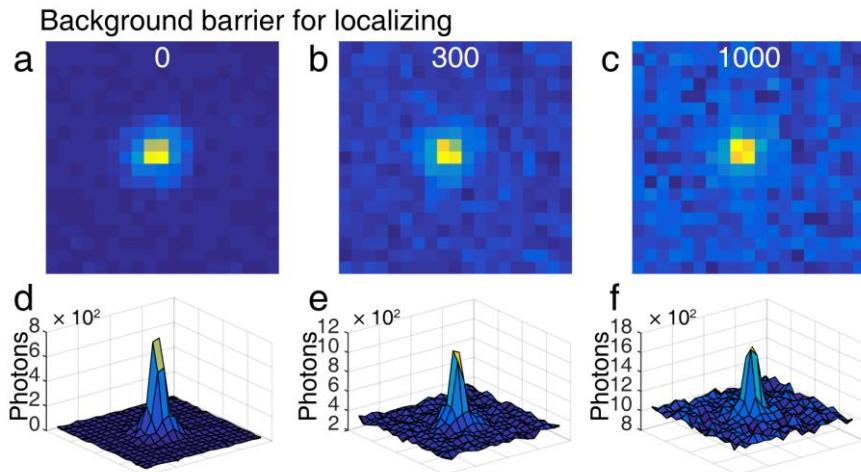


图 70. 三维单分子定位的背景障碍

Fig 70. Background barrier for three-dimensional single-molecule localization
Top panel shows a simulation of single-molecule signals (1000 photons) at different levels of background (a, 0; b, 300; c, 1000; units, photons per frame). Bottom panel exhibits the surface plots (d, e, f) of the same signals.

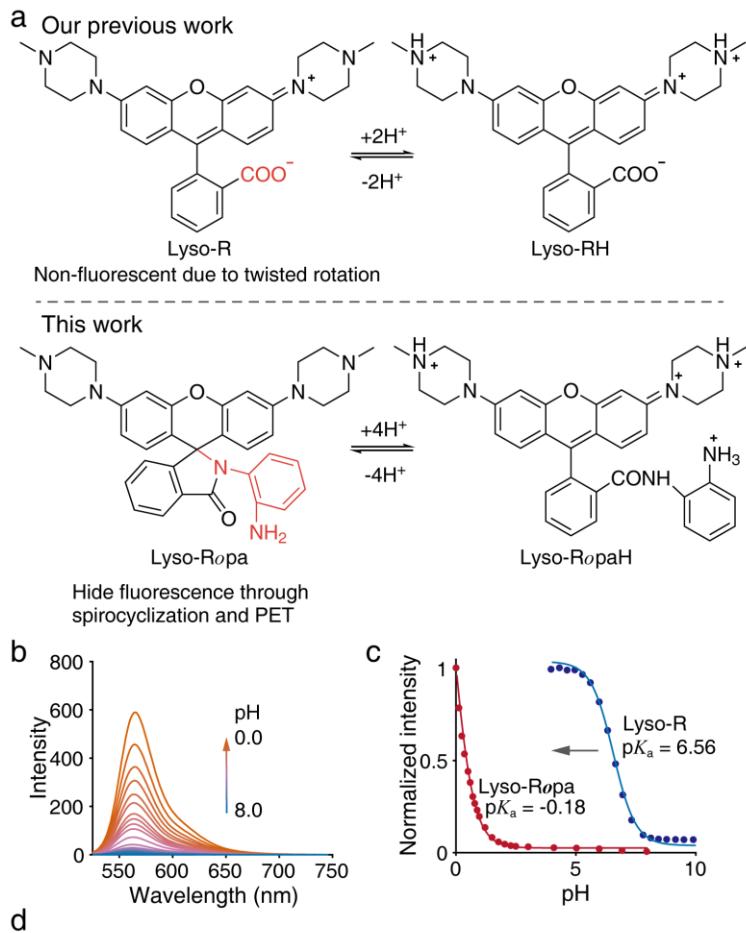
不同与二维超分辨成像对于质心的寻求，三维的单分子定位需要基于单分子信号的形态^[95-97]。为此，三维成像必须改造单分子点扩散函数 (point spread function, PSF)，使得单分子点扩散函数的形态随着单分子信号相对焦面轴向分布位置不同而出现可解析的差异。一种非常典型的改造策略是引入圆柱棱镜^[151-154]，它将轴向对称的单分子点扩散函数变为垂直取向不同的椭圆形态。然而，三维定位对于形态的追求，对于荧光染料的信噪比提出了极高要求。影响信噪比至关重要的因素是背景噪音 (图 70)：模拟结果显示，当没有背景噪音时，单分子信号具有清晰的形态 (图 70a、d)；但当背景噪音提升至 300 光

子时，信号边缘像素淹没在噪音中无法分辨（图 70b、e）；当背景提升至与信号同样的亮度时，整个信号边缘像素淹没在背景中，只剩下中心突出部分可以勉强分辨（图 70c、f）。为此，应当发展染料分子设计，以超越背景噪音屏障，适用于三维超分辨成像。

然而，常见染料总不可避免出现非特异性着色和背景荧光，对定位精确性产生极大干扰。为避免这些背景噪音，研究者在成像时总需要对样品多次洗涤，显著增加了样品制备的复杂性和标记脱离的风险。洗涤的必要性，突显设计免洗同时免除背景的超分辨成像荧光染料重要意义。而在单分子定位超分辨成像中，这类染料的分子设计要求很高：当处于背景着色（细胞环境，包括各类膜结构，缓冲液和盖玻片表面）时，染料不仅不能产生轻微的背景荧光发射，亦不能在高强度激光照明下产生非特异单分子信号；染料对目标有稳定的标记，在标记对象上形成强烈的荧光发射和单分子事件。罕有染料可满足这些超越传统成像的要求。

6.2 超越背景屏障罗丹明溶酶体探针设计

针对免洗免背景荧光的分子设计需求，首先应寻求具有特定环境特点的细胞内标记靶向物。溶酶体是一类典型的亚细胞器，它具有区别于其它细胞组分的酸性环境^[155]。基于这种 pH 的差异性，本人在博士期间曾构建溶酶体探针 Lyso-R（图 71a）^[35,132]，它在溶酶体酸性环境中发生哌嗪的质子季铵化过程，恢复荧光发射，从而形成对溶酶体的靶向成像。然而，该染料在细胞基质中性 pH 环境和在盖玻片表面部分分子处于亮态，形成厚重的荧光背景信号，对超分辨成像产生干扰。为了尽可能减少这些影响，本人曾采取洗涤的方法，但这需要个性化实验设置，针对不同样品的洗涤次数和强度很难把握：当洗涤次数过多时，细胞内的染料信号会减少，重构成像的完整性下降；当洗涤次数过少时，背景增强。这样为成像样品制备带来的极大复杂性。



^a ε , λ_{Ab} , λ_{Em} and Φ were determined in dichloromethane with 10% trifluoroacetic acid; pK_a was determined from fluorescence titration curves of fluorophore in PBS solution (contained 30% ethanol);

^b bracketed pK_a was determined from absorption titration curves;

^c quoted from ref.28. (spectroscopic characteristics measured in aqueous solution at pH=4.0).

图 71. 设计一种超越背景屏障的罗丹明溶酶体染料

Fig 71. Design of a rhodamine lysosomal probe surpassing the background barrier.

(a) Molecular principle to cancel the fluorescence of piperazine rhodamines. (b) Fluorescence spectra of Lyso-Ropa at a series of pH conditions. (c) Comparison on pH titration curves of two piperazine rhodamines. (d) Summarized spectroscopic character- statistics of piperazine rhodamines.

为了消除这种背景噪音污染, 可进一步将哌嗪罗丹明染料修饰为罗丹明螺内酰胺, 通过螺环化关环形式, 限制染料处于暗态, 最大程

度将中性环境中染料压制成无可见荧光发射的隐色体形式。受典型的 NO 响应探针^[156]设计启发,为了尽可能的将染料限制在关环隐色体,可将邻苯二胺缩合到咕吨 9 位芳香取代基羧基上,通过邻近氨基中性环境质子化,对质子参与螺环开环反应再限制(图 71a);即使特殊条件下氨基未发生质子化,也有可能通过光激活电子转移过程的发生抑制罗丹明染料的发光。这样设计的罗丹明探针 Lyso-Ropa 具有很大的希望抑制在非酸性环境的所有荧光效应和单分子事件,具备实现免洗和超越背景障碍成像潜能。

Lyso-Ropa 染料易于合成,可通过三氯氧磷活化哌嗪罗丹明咕吨 9 位苯基邻位羧基,再与邻苯二胺缩合获得。新染料的质子滴定荧光光谱可参见图 71b,随着质子浓度的提升,染料荧光出现从无到有的增强($\lambda_{Em} = 554$ nm)。相较于 Lyso-R ($pK_a = 6.56$), Lyso-Ropa 显示出显著向酸性移动的 pK_a (-0.18, 图 71c),显示出螺环酰胺化对于染料的隐色效应强化作用。不仅如此,质子化后 Lyso-RopaH 保持有季铵化哌嗪染料相似的极高量子产率 (~1, 图 71d),这说明螺环酰胺改变并未影响季铵化哌嗪罗丹明染料的亮度, Lyso-Ropa 仍然具有适用于超分辨成像的良好荧光亮度特征。

6.3 超越背景屏障单分子定位信号

受 Lyso-Ropa 的优秀荧光光谱性质激励,下面进一步通过比较研究方式,分析新染料对溶酶体超分辨成像的效果。由于 Lyso-Ropa 的螺环开关换平衡过程对质子敏感性急剧减弱,这类染料很可能在成像中可以实现免洗成像,因而对比成像在免洗染色成像的条件下完成。

图 72a 展示了在免洗成像 HeLa 细胞时, Lyso-R 与 Lyso-Ropa 典型的单分子信号。在相同条件下, Lyso-R 展现出大量的来源于细胞内基质和细胞外盖玻片表面的背景噪音和单分子事件;受这些背景信号干扰, Lyso-R 的成像几乎不能分辨单个分子信号。与此截然相反的是, Lyso-Ropa 由于其显著向酸性移动的螺环开关环平衡,在免洗条件下,几乎不在中性环境的细胞基质、膜及盖玻片表面形成单分子信号,且在缓冲液中几乎没有背景荧光发射,具有完全清洁的背景。在酸性溶酶体内, Lyso-Ropa 由于较高浓度质子影响,稀疏形成单分子信号,基于清洁的背景,这些信号具有良好的信噪比。

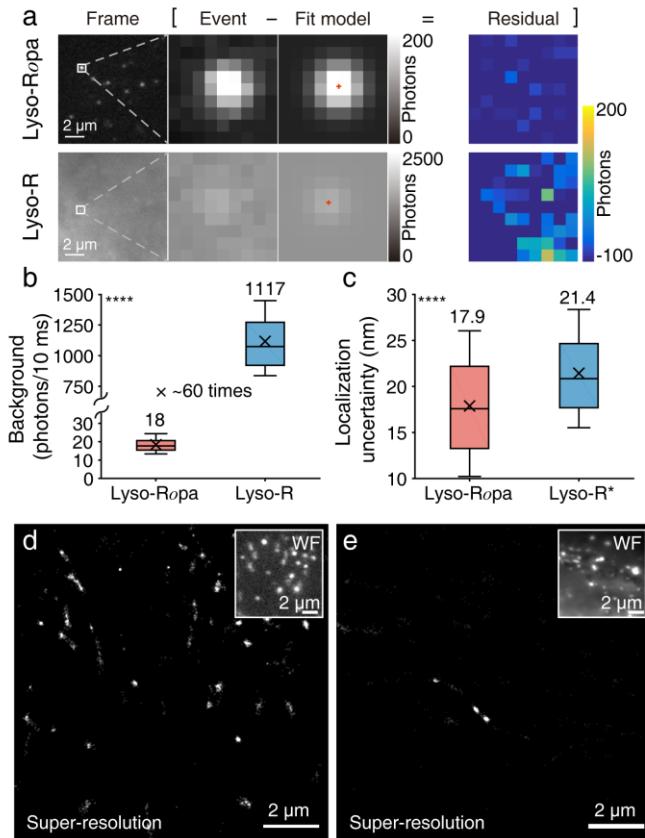


图 72. Lyso-Ropa 与设计母体 Lyso-R 的超分辨成像能力比较研究

Fig 72. Comparison study on the super-resolution imaging capability between Lyso-Ropa and Lyso-R.

(a) Comparison of experimental single-molecule signals from Lyso-Ropa and Lyso-R in no-wash-stained live HeLa cells. Magnification shows typical single-molecule events, the fit models, and the unused photon residual. Red crosses indicate the localized position of molecules. The pixel size is 104 nm. Comparison of the (b) background and (c) localization uncertainties between two fluorophores. Asterisk (*) labeling marks the counting bias, due to the high backgrounds. The significance was determined by the two- sample t-test: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; and **** $P < 0.0001$. Typical super-resolution reconstructions of lysosomes from (d) Lyso-Ropa and (e) Lyso-R. The insets show the conventional image (WF) acquired from the same location.

定量化的的单分子信号统计显示, Lyso-R 具有 60 倍于 Lyso-Ropa 的背景噪音 (图 72b), 同时其定位精度也显著低于 Lyso-Ropa (图 72c)。由于 Lyso-Ropa 的高质量单分子信号, 溶酶体在超分辨成像中被完全重构 (图 72d)。与之形成突出对比的是, Lyso-R 的大量信号

淹没在背景噪音内, 它染色细胞的超分辨成像完全无法重构出溶酶体, 仅展示出少数单分子亮度极高的定位亮点 (图 72e)。由于 Lyso-Ropa 酸性迁移的螺环开环过程, 该染料展示了对溶酶体免洗的单分子定位超分辨成像功能。

6.4 免洗活细胞溶酶体三维超分辨动态成像

基于 Lyso-Ropa 的免洗成像潜能, 下面尝试利用该染料免洗染色对活细胞溶酶体进行了三维单分子定位超分辨动态成像。图 73a 展示了 HeLa 活细胞溶酶体的三维成像结果, 不同颜色表明溶酶体相对焦面的 z 轴深度位置。相比于传统荧光成像结果 (图 73b), 三维超分辨成像展示出显著的清晰度提升。由于 Lyso-Ropa 向强酸性移动的质子解离常数, 成像可在免洗和活细胞条件下进行, 并且几乎没有产生单分子背景噪音信号; 另一方面, Lyso-Ropa 在酸性环境的自闪烁特点, 成像可在 2 s 内收集完全单分子信号, 完成溶酶体重构, 具有很高的时间分辨率。将重构的溶酶体部分投影在 xz 和 yz 平面上 (ROI1, ROI2, 图 73a), 结果清晰显示了从细胞核心到细胞边缘逐渐贴近盖玻片, z 位置降低的轴向分布特征。同时, 基于 Delaunay 三角剖分方法, 对成像的溶酶体三维结构进行了重建。图 73c 展示了 ROI3 区域放大的三维超分辨成像结果, 对这一区域的溶酶体进行三维重构, 其结果可见图 73d, 大部分溶酶体展现出类似球体或者椭圆球体特征。另一方面, 三维重建也揭示了两个溶酶体之间的空间位置关系, 图 73e 是三维成像 ROI4 区域的放大图, 图中似乎显示了两个溶酶体, 但在二维投影上, 两个溶酶体并不能清晰分辨。当把这一区域用三维数据进行重建后 (图 73f), 可看出两个溶酶体在空间上是相互分开的状态。对溶酶体的三维重建, 更清晰揭示出溶酶体在瞬时的形貌特征, 图 73g-h 和图 73i-j 分别展示了两种典型形貌的溶酶体: 一种是具有棒状结构的溶酶体; 另一种是球形结构特点的溶酶体。其中, 前者也有可能与溶酶体的快速移动有关, 在成像 2 s 时间内溶酶体的移动很可能导致重构在移动方向的变形。得益于 Lyso-Ropa 在溶酶体上可持续形成的单分子信号, 三维超分辨成像可以拓展到时间维度上, 实现对活细胞溶酶体动态重建。图 73k-l 中箭头展示了溶酶体的融合 (红色) 和分裂 (黄色) 过程。

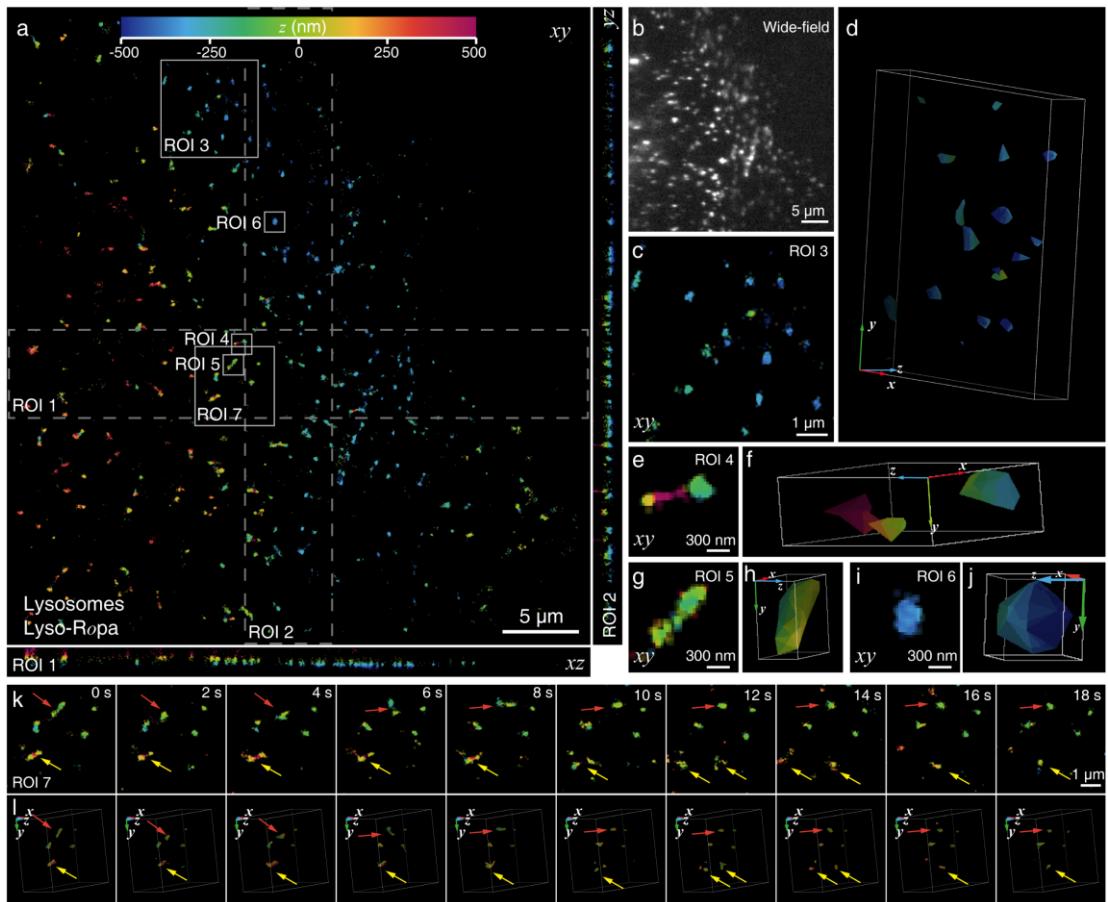


图 73. 通过 Lyso-Ropa 对 HeLa 活细胞的免洗溶酶体超分辨成像

Fig 73. Multidimensional single-molecule super-resolution imaging of lysosomes in a live HeLa cell by no-wash Lyso-Ropa staining.

(a) 3D super-resolution image of lysosomes reconstructed at a temporal resolution of 2 s. Adjacent insets show the cross-sectional views of the highlighted region of interests (ROIs 1–2). (b) Conventional fluorescent image of the same lysosomes in (a). Highlighted lysosomes (ROIs 3–6) were magnified (c, e, g, i) and modeled in 3D (d, f, h, j) on the basis of Delaunay triangulation. (k) Super-resolution images and (l) 3D models of lysosomal evolution on the time domain. For all 3D models, the lengths of axes are utilized as the scale bars: (d, l) 1 μ m and (f, h, j) 300 nm.

基于 Lyso-Ropa 对溶酶体免洗三维成像能力, 对不同压力状态下细胞溶酶体进行了三维超分辨成像分析。图 74a 和图 74b 展示了典型的正常和饥饿状态下 HeLa 细胞溶酶体三维超分辨成像结果, 相较于正常状态下 HeLa 细胞的溶酶体球形(投影成圆形)特征, 饥饿状态下溶酶体大量变成长条状。对这些溶酶体进行三维重建, 并且对每种条件下的溶酶体三维结构特征进行了统计分析, 其结果列于图 74c 中。

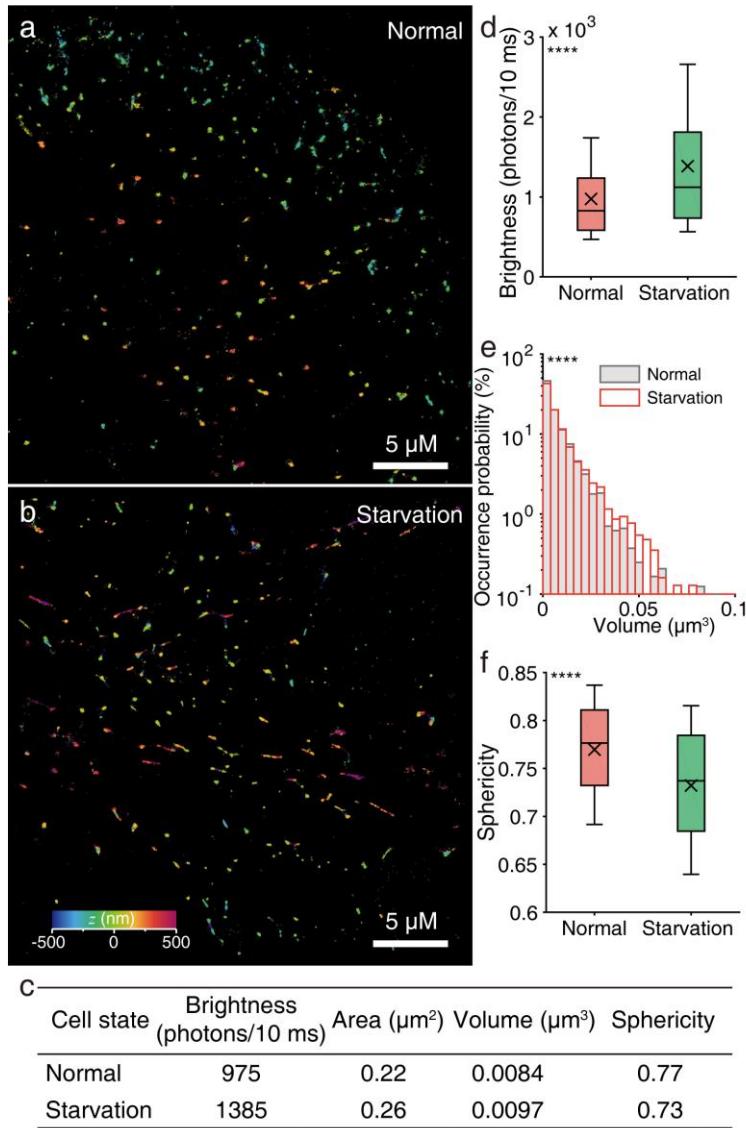


图 74. 活 HeLa 细胞正常和饥饿状态的溶酶体超分辨率重构

Fig 74. Super-resolution reconstructions of lysosomes in normal and starved live HeLa cells.

Reconstructed lysosomes in (a) normal and (b) starved cells. (c) Summarized statistics for lysosomes at two conditions. Comparison on the (d) single-molecule brightness of Lyso-Ropa, (e) lysosomal volumes, and (f) sphericities in cells at normal and starvation conditions (number of localizations $n > 4.3 \times 10^6$; number of lysosomes $n > 2400$). The significance was determined by the two-sample t-test: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; and **** $P < 0.0001$.

在饥饿状态细胞的溶酶体上, Lyso-Ropa 展现出更强的单分子亮度 (图 74d, 1385 photons/10 ms 饥饿 vs 975 photons/10 ms 正常)。这

很可能与饥饿状态酸性溶酶体的比例增加有关, Lyso-Ropa 在质子浓度更高的环境内展现出增强的单分子爆发力。在饥饿状态下, 溶酶体的体积也出现一定程度增加 (图 74e, $0.0097 \mu\text{m}^3$ 饥饿 vs $0.0087 \mu\text{m}^3$ 正常), 同时整体的球形度也有所下降 (图 74f, 0.73 饥饿 vs 0.77 正常)。统计结果与成像观察到大量的棒状溶酶体结果一致, 这些变化显示出饥饿状态下强化的溶酶体活力。

6.5 总结

针对三维单分子定位对于背景噪音污染的敏感性, 发展一种免洗超越背景屏障的哌嗪罗丹明染料 Lyso-Ropa。相较于其母体 Lyso-R, 新染料展现出了免洗单分子定位成像的能力。通过这种染料对活细胞溶酶体染色, 可实现免洗三维超分辨成像与三维溶酶体动态重建。通过 Lyso-Ropa 的染色, 分析了不同压力状态下活细胞溶酶体的三维结构, 其结果显示出细胞饥饿状态时更强活力溶酶体的棒状超微形态学。

7 结论

超分辨成像是举世瞩目的革命性光学显微成像技术,已成为科学的前沿研究工具。虽然调制光场型和单分子定位型成像基于截然不同的超分辨率机制,但其成像均需荧光染料作为提供光子信息的核心媒介完成。然而,分子尺度及更高尺度的分辨率构筑在更高质量的光子信息上,这对荧光染料提出了超越传统尺度的单分子光物理性质需求。

针对超分辨成像对于高性能荧光染料的需求,染料研究工作者对染料母体、连接链和标记方式进行了大量的研究和优化工作。本文尝试在首章对近三年(2020年-2022年)的前沿工作进行了综述,但纵观目前的研究工作,基于单分子尺度光物理性质调控仍然构成了现代荧光染料研究的局限性。

为开发现代超分辨成像荧光染料,本文首先(第二章)对实验室现有二维成像显微镜进行了拓展。基于柱棱镜引入和三次样条算法,构建包含轴向信息的单分子点扩散函数,并实现对样品的三维超分辨成像,成像的z轴精确度可达到 18.1 ± 5.0 nm。通过发展自然邻近插值算法,校正双通道同时成像的色差,其校正精确度可达到 7.4 ± 5.6 nm。通过算法开发和光路调节融合,实现超分辨成像显微镜维度拓展;在多维度显微镜拓展的基础上,本文第三-六章发展了一系列的超分辨成像荧光染料。

针对自闪烁罗丹明染料的热力学常数定义缺陷,本文第三章发展和探索了一系列具有螺环开关环平衡过程的磺酸罗丹明染料。基于甘氨酸罗丹明染料满足自闪烁热力学常数定义却难以实现超分辨成像的事实,酸解离常数(pK_a)并不能反映自闪烁过程的单分子事件发生。通过对自闪烁罗丹明染料的单分子光物理性质对比研究,本文首次提出以罗丹明染料分子从螺环关环转换到开环的分子速率,招募速率(k_{rc}),作为衡量自闪烁转换单分子事件的动力学标准。该速率独立于成像激发光强,反映了分子自身结构的开关速率性质。

针对红细胞及其膜在生物医学诊断领域的核心意义,发展一种对红细胞膜的超微结构和动力学进行分子诊断的氟硼吡咯探针。该探针展现出红外发光,避免了血红蛋白聚集的自发背景荧光干扰;同时,该探针具有平衡的闪烁与亮态持续性,可兼备单分子定位和追踪成像

的功能性质。通过与微流控芯片技术融合，本文实现对正常和异常红细胞膜的分子诊断及首次对活红细胞膜的三维超分辨成像解析。

为解决作者过去合作开发的亚硝基笼化光激活染料标记适用性，本文尝试为亚硝基笼化罗丹明设计了生物正交标记体系。在研究中亚硝基笼化染料展现出前所未有的可见光激活特性，可实现单激光的激活与激发同时成像。基于四嗪-环辛炔体系的引入，亚硝基笼化罗丹明染料可对固定细胞微管，活细胞线粒体、代谢物（甘露糖）及蛋白质（细胞核 H2B 组蛋白）实现单分子定位超分辨成像。

为解决三维成像的荧光背景障碍问题，本文基于溶酶体酸性特点，通过螺酰胺及邻苯二胺取代基设计，发展一种酸性移动荧光响应的季铵化哌嗪罗丹明探针，Lyso-Ropa。相比于其母核，哌嗪罗丹明（Lyso-R），新染料的 pK_a 处于强酸性区间（-0.18），因而在中性背景环境中无任何背景荧光信号。通过 Lyso-Ropa 的免洗染色，本文成功对活细胞溶酶体进行了三维动态成像，并对病态（饥饿）及正常状态下溶酶体的三维结构进行了重塑、对比和研究。

本文发展的多维度超分辨成像系统及超高性能荧光染料，将拓展超分辨成像在活细胞等脆弱介质样品的观测可行性，为拓展科学的研究边界提供基础性工具。基于单分子尺度光物理性质的染料功能性探索，将为未来荧光染料发展提供新的基准和目标。基于超分辨成像荧光显微镜的革命性科学工具意义，有理由相信针对超分辨成像需求而开发的下一代荧光染料将成为新的科学的研究航标。

参考文献

- [1] Betzig Eric, Patterson George H, Sougrat Rachid, Lindwasser O Wolf, Olenych Scott, Bonifacino Juan S, Davidson Michael W, Lippincott-Schwartz Jennifer, Hess Harald F. Imaging Intracellular Fluorescent Proteins at Nanometer Resolution. *Science*. 2006, 313(5793):1642–1645.
- [2] Hess Samuel T, Girirajan Thanu P K, Mason Michael D. Ultra-High Resolution Imaging by Fluorescence Photoactivation Localization Microscopy. *Biophysical Journal*. 2006, 91(11):4258–4272.
- [3] Rust Michael J, Bates Mark, Zhuang Xiaowei. Sub-Diffraction-Limit Imaging by Stochastic Optical Reconstruction Microscopy (STORM). *Nature Methods*. 2006, 3793–796.
- [4] Gustafsson M G L. Surpassing the Lateral Resolution Limit by a Factor of Two Using Structured Illumination Microscopy. *Journal of Microscopy*. 2000, 198(2):82–87.
- [5] Klar Thomas A., Jakobs Stefan, Dyba Marcus, Egner Alexander, Hell Stefan W. Fluorescence Microscopy with Diffraction Resolution Barrier Broken by Stimulated Emission. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000, 97(15):8206–8210.
- [6] Xu Ke, Zhong Guisheng, Zhuang Xiaowei. Actin, Spectrin, and Associated Proteins Form a Periodic Cytoskeletal Structure in Axons. *Science*. 2013, 339(6118):452–456.
- [7] Nixon-Abell Jonathon, Obara Christopher J, Weigel Aubrey V, Li Dong, Legant Wesley R, Xu C Shan, Pasolli H Amalia, Harvey Kirsten, Hess Harald F, Betzig Eric, Blackstone Craig, Lippincott-Schwartz Jennifer. Increased Spatiotemporal Resolution Reveals Highly Dynamic Dense Tubular Matrices in the Peripheral ER. *Science*. 2016, 354(6311):aaf3928.
- [8] Szymborska Anna, Marco Alex De, Daigle Nathalie, Cordes Volker C, Briggs John A G, Ellenberg Jan. Nuclear Pore Scaffold Structure Analyzed by Super-Resolution Microscopy and Particle Averaging. *Science*. 2013, 341(2013):655–658.
- [9] Hell Stefan W, Wichmann Jan. Breaking the Diffraction Resolution Limit by Stimulated Emission: Stimulated-Emission-Depletion Fluorescence Microscopy. *Optics Letters*. 1994, 19(11):780–782.
- [10] Balzarotti Francisco, Eilers Yvan, Gwosch Klaus C, Gynnå Arvid H, Westphal Volker, Stefani Fernando D, Elf Johan, Hell Stefan W. Nanometer Resolution Imaging and Tracking of Fluorescent Molecules with Minimal Photon Fluxes. *Science*. 2017, 355(6325):606–612.
- [11] Ha Taekjip, Tinnefeld Philip. Photophysics of Fluorescent Probes for Single-Molecule Biophysics and Super-Resolution Imaging. *Annual Review Of Physical Chemistry*. 2012, 63:595–617.
- [12] van de Linde S, Sauer M. How to Switch a Fluorophore: From Undesired Blinking to Controlled Photoswitching. *Chemical Society Reviews*. 2014, 43(4):1076–1087.
- [13] Li Honglin, Vaughan Joshua C. Switchable Fluorophores for Single-Molecule Localization Microscopy. *Chemical Reviews*. 2018, 118(18):9412–9454.
- [14] Vogelsang Jan, Steinhauer Christian, Forthmann Carsten, Stein Ingo H, Person-Skegro Britta, Cordes Thorben, Tinnefeld Philip. Make Them Blink: Probes for Super-Resolution Microscopy. *Chemphyschem*. 2010, 11(12):2475–2490.
- [15] Minsky Marvin. Microscopy Apparatus, US3013467, 1961.
- [16] Favro Lawrence D., Thomas Robert L., Kuo Pao-Kuang, Li-FAVRO Chen, Lawrence D, Thomas, L. Robert, Kuo, Pao-Kuang, Chen, Li. Confocal Microscope, US5162941, 1992.
- [17] Hayashi Shinichi, Okada Yasushi. Ultrafast Superresolution Fluorescence Imaging with Spinning Disk Confocal Microscope Optics. *Molecular Biology of the Cell*. 2015, 26(9):1743–1751.
- [18] Hayashi Shinichi. Resolution Doubling Using Confocal Microscopy via Analogy with Structured Illumination Microscopy. *Japanese Journal of Applied Physics*. 2016, 55(8):82501.
- [19] Gustafsson M G L. Surpassing the Lateral Resolution Limit by a Factor of Two Using Structured Illumination Microscopy. *Journal of Microscopy*. 2000, 198(2):82–87.

- [20] Shao Lin, Kner Peter, Rego E Hesper, Gustafsson Mats G L. Super-Resolution 3D Microscopy of Live Whole Cells Using Structured Illumination. *Nature Methods*. 2011, 8(12):1044–1046.
- [21] Li Dong, Shao Lin, Chen Bi-Chang, Zhang Xi, Zhang Mingshu, Moses Brian, Milkie Daniel E, Beach Jordan R, Hammer John A, Pasham Mithun, Kirchhausen Tomas, Baird Michelle A, Davidson Michael W, Xu Pingyong, Betzig Eric. Extended-Resolution Structured Illumination Imaging of Endocytic and Cytoskeletal Dynamics. *Science*. 2015, 349(6251):aab3500.
- [22] Huang Xiaoshuai, Fan Junchao, Li Liuju, Liu Haosen, Wu Runlong, Wu Yi, Wei Lisi, Mao Heng, Lal Amit, Xi Peng, Tang Liqiang, Zhang Yunfeng, Liu Yanmei, Tan Shan, Chen Liangyi. Fast, Long-Term, Super-Resolution Imaging with Hessian Structured Illumination Microscopy. *Nature Biotechnology*. 2018, 36:451–459.
- [23] Klar T. A., Jakobs S., Dyba M., Egner A., Hell S. W. Fluorescence Microscopy with Diffraction Resolution Barrier Broken by Stimulated Emission. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000, 97(15):8206–8210.
- [24] Hell Stefan W. Toward Fluorescence Nanoscopy. *Nature biotechnology*. 2003, 21(11):1347–1355.
- [25] Sharonov Alexey, Hochstrasser Robin M. Wide-Field Subdiffraction Imaging by Accumulated Binding of Diffusing Probes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006, 103(50):18911–18916.
- [26] Fölling Jonas, Bossi Mariano, Bock Hannes, Medda Rebecca, Wurm Christian A, Hein Birk, Jakobs Stefan, Eggeling Christian, Hell Stefan W. Fluorescence Nanoscopy by Ground-State Depletion and Single-Molecule Return. *Nature Methods*. 2008, 5(11):943–945.
- [27] Sauer Markus, Heilemann Mike. Single-Molecule Localization Microscopy in Eukaryotes. *Chemical Reviews*. 2017, 117(11):7478–7509.
- [28] Li Yiming, Mund Markus, Hoess Philipp, Deschamps Joran, Matti Ulf, Nijmeijer Bianca, Sabinina Vilma Jimenez, Ellenberg Jan, Schoen Ingmar, Ries Jonas. Real-Time 3D Single-Molecule Localization Using Experimental Point Spread Functions. *Nature Methods*. 2018, 15(5):367–369.
- [29] Mortensen Kim I, Churchman L Stirling, Spudich James A, Flyvbjerg Henrik. Optimized Localization Analysis for Single-Molecule Tracking and Super-Resolution Microscopy. *Nature Methods*. 2010, 7:377–381.
- [30] Deschout Hendrik, Zanacchi Francesca Cella, Mlodzianoski Michael, Diaspro Alberto, Bewersdorf Joerg, Hess Samuel T, Braeckmans Kevin. Precisely and Accurately Localizing Single Emitters in Fluorescence Microscopy. *Nature Methods*. 2014, 11:253–266.
- [31] Yu Haibo, Xiao Yi, Jin Liji. A Lysosome-Targetable and Two-Photon Fluorescent Probe for Monitoring Endogenous and Exogenous Nitric Oxide in Living Cells. *Journal Of The American Chemical Society*. 2012, 134(42):17486–17489.
- [32] Johnson L V, Walsh M L, Chen L B. Localization of Mitochondria in Living Cells with Rhodamine 123. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1980, 77(2):990–994.
- [33] Klymchenko Andrey S, Duportail Guy, Mély Yves, Demchenko Alexander P. Ultrasensitive Two-Color Fluorescence Probes for Dipole Potential in Phospholipid Membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003, 100(20):11219–11224.
- [34] Spence, M. T. Z., Johnson, I. D., Eds. *The Molecular Probes Handbook: A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*. 2010.
- [35] Ye Zhiwei, Xiao Yi, Guo Haiying, Wang Chao. Specific and Photostable Rhodamine-Based Tracker for 3D Video Imaging of Single Acidic Organelles. *RSC Advances*. 2014, 4(71):37547–37555.
- [36] Pan Deng, Hu Zhe, Qiu Fengwu, Huang Zhen-Li, Ma Yilong, Wang Yina, Qin Lingsong, Zhang

Zhihong, Zeng Shaoqun, Zhang Yu-Hui. A General Strategy for Developing Cell-Permeable Photo-Modulatable Organic Fluorescent Probes for Live-Cell Super-Resolution Imaging. *Nature Communications*. 2014, 55573.

[37] Kolb Hartmuth C, Finn M G, Sharpless K Barry. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angewandte Chemie International Edition*. 2001, 40(11):2004–2021.

[38] Devaraj Neal K, Weissleder Ralph, Hilderbrand Scott A. Tetrazine-Based Cycloadditions: Application to Pretargeted Live Cell Imaging. *Bioconjugate Chemistry*. 2008, 19(12):2297–2299.

[39] Royzen Maksim, Yap Glenn P A, Fox Joseph M. A Photochemical Synthesis of Functionalized Trans-Cyclooctenes Driven by Metal Complexation. *Journal of the American Chemical Society*. 2008, 130(12):3760–3761.

[40] Sauer Jürgen, Bäuerlein Peter, Ebenbeck Wolfgang, Gousetis Charalampos, Sichert Heinz, Troll Theodor, Utz Ferdinand, Wallfahrer Uwe. [4+2] Cycloadditions of 1,2,4,5-Tetrazines and Cyclopropenes – Synthesis of 3,4-Diazanorcaradienes and Tetracyclic Aliphatic Azo Compounds. *European Journal of Organic Chemistry*. 2001, 2001(14):2629–2638.

[41] Baskin Jeremy M, Prescher Jennifer A, Laughlin Scott T, Agard Nicholas J, Chang Pamela V, Miller Isaac A, Lo Anderson, Codelli Julian A, Bertozzi Carolyn R. Copper-Free Click Chemistry for Dynamic in Vivo Imaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007, 104(43):16793–16797.

[42] Tornøe Christian W, Christensen Caspar, Meldal Morten. Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides. *The Journal of Organic Chemistry*. 2002, 67(9):3057–3064.

[43] Heilemann Mike, Margeat Emmanuel, Kasper Robert, Sauer Markus, Tinnefeld Philip. Carbocyanine Dyes as Efficient Reversible Single-Molecule Optical Switch. *Journal of the American Chemical Society*. 2005, 127(11):3801–3806.

[44] Holzmeister Phil, Gietl Andreas, Tinnefeld Philip. Geminate Recombination as a Photoprotection Mechanism for Fluorescent Dyes. *Angewandte Chemie International Edition*. 2014, 53(22):5685–5688.

[45] Dempsey Graham T, Bates Mark, Kowtoniuk Walter E, Liu David R, Tsien Roger Y, Zhuang Xiaowei. Photoswitching Mechanism of Cyanine Dyes. *Journal of the American Chemical Society*. 2009, 131(51):18192–18193.

[46] Marcus Y. The Properties of Organic Liquids That Are Relevant to Their Use as Solvating Solvents. *Chemical Society Reviews*. 1993, 22(6):409–416.

[47] Kamlet Mortimer J, Taft R W. The Solvatochromic Comparison Method. I. The β -Scale Of Solvent Hydrogen-Bond Acceptor (HBA) Basicities. *Journal of the American Chemical Society*. 1976, 98(2):377–383.

[48] Taft R. W., Kamlet Mortimer J. The Solvatochromic Comparison Method. 2. The α -Scale of Solvent Hydrogen-Bond Donor (HBD) Acidities. *Journal of the American Chemical Society*. 1976, 98(10):2886–2894.

[49] Grabowski Zbigniew R, Rotkiewicz Krystyna, Rettig Wolfgang. Structural Changes Accompanying Intramolecular Electron Transfer: Focus on Twisted Intramolecular Charge-Transfer States and Structures. *Chemical Reviews*. 2003, 103(10):3899–4032.

[50] Grabowski Zbigniew R. Twisted Intramolecular Charge Transfer (TICT) Excited States: Energy and Molecular Structure. *Pure and Applied Chemistry*. 1983, 55(2):245–252.

[51] Kavarnos George J, Turro Nicholas J. Photosensitization by Reversible Electron Transfer: Theories, Experimental Evidence, and Examples. *Chemical Reviews*. 1986, 86(2):401–449.

[52] Bryan Aiden J, de Silva A.Prasanna, De Silva Saliya A, Rupasinghe R.A.D.Dayasiri, Sandanayake K.R.A.Samankumara. Photo-Induced Electron Transfer as a General Design Logic for

- Fluorescent Molecular Sensors for Cations. *Biosensors*. 1989, 4(3):169–179.
- [53] Lord Samuel J, Conley Nicholas R, Lee Hsiao-lu D, Samuel Reichel, Liu Na, Twieg Robert J, Moerner W E. A Photoactivatable Push-Pull Fluorophore for Single-Molecule Imaging in Live Cells. *Journal of the American Chemical Society*. 2008, 130(29):9204–9205.
- [54] Kim Ha Na, Lee Min Hee, Kim Hyun Jung, Kim Jong Seung, Yoon Juyoung. A New Trend in Rhodamine-Based Chemosensors: Application of Spirolactam Ring-Opening to Sensing Ions. *Chemical Society Reviews*. 2008, 37(8):1465–1472.
- [55] Chen Xiaoqiang, Pradhan Tuhin, Wang Fang, Kim Jong Seung, Yoon Juyoung. Fluorescent Chemosensors Based on Spiroring-Opening of Xanthenes and Related Derivatives. *Chemical Reviews*. 2012, 112(3):1910–1956.
- [56] Nolan Elizabeth M, Lippard Stephen J. Tools and Tactics for the Optical Detection of Mercuric Ion. *Chemical Reviews*. 2008, 108(9):3443–3480.
- [57] Zhang Xinfu, Wang Benlei, Xiao Yi, Wang Chao, He Ling. Targetable, Two-Photon Fluorescent Probes for Local Nitric Oxide Capture in the Plasma Membranes of Live Cells and Brain Tissues. *Analyst*. 2018, 143(17):4180–4188.
- [58] Wang Lu, Xiao Yi, Tian Wenming, Deng Liezheng. Activatable Rotor for Quantifying Lysosomal Viscosity in Living Cells. *Journal of the American Chemical Society*. 2013, 135(8):2903–2906.
- [59] Bittel Amy M, Nickerson Andrew, Saldivar Isaac S, Dolman Nick J, Nan Xiaolin, Gibbs Summer L. Methodology for Quantitative Characterization of Fluorophore Photoswitching to Predict Superresolution Microscopy Image Quality. *Scientific Reports*. 2016, 629687.
- [60] Grimm Jonathan B, English Brian P, Chen Jiji, Slaughter Joel P, Zhang Zhengjian, Revyakin Andrey, Patel Ronak, Macklin John J, Normanno Davide, Singer Robert H, Lionnet Timothée, Lavis Luke D. A General Method to Improve Fluorophores for Live-Cell and Single-Molecule Microscopy. *Nature Methods*. 2015, 12(3):244–250.
- [61] Olivier Nicolas, Keller Debora, Gönczy Pierre, Manley Suliana. Resolution Doubling in 3D-STORM Imaging through Improved Buffers. *PLOS ONE*. 2013, 8(7):1–9.
- [62] Olivier Nicolas, Keller Debora, Rajan Vinod Sundar, Gönczy Pierre, Manley Suliana. Simple Buffers for 3D STORM Microscopy. *Biomedical Optics Express*. 2013, 4(6):885–899.
- [63] Xue Lin, Karpenko Iuliia A, Hiblot Julien, Johnsson Kai. Imaging and Manipulating Proteins in Live Cells through Covalent Labeling. *Nature Chemical Biology*. 2015, 11(12):917–923.
- [64] Cella Zanacchi Francesca, Lavagnino Zeno, Perrone Donnorso Michela, Del Bue Alessio, Furia Laura, Faretta Mario, Diaspro Alberto. Live-Cell 3D Super-Resolution Imaging in Thick Biological Samples. *Nature Methods*. 2011, 81047–1050.
- [65] Klein Teresa, Löschberger Anna, Proppert Sven, Wolter Steve, van de Linde Sebastian, Sauer Markus. Live-Cell DSTORM with SNAP-Tag Fusion Proteins. *Nature Methods*. 2011, 8(1):7–9.
- [66] Wu Xia, Gao Ying, Chi Weijie, Wang Chao, Xu Zhaochao, Liu Xiaogang. Molecular Design of Dual-Emission Rhodamine Analogs. *Materials Chemistry Frontiers*. 2023, 7(6):1137–1145.
- [67] Lardon Nicolas, Wang Lu, Tschanz Aline, Hoess Philipp, Tran Mai, D’Este Elisa, Ries Jonas, Johnsson Kai. Systematic Tuning of Rhodamine Spirocyclization for Super-Resolution Microscopy. *Journal of the American Chemical Society*. 2021, 143(36):14592–14600.
- [68] Wang Lu, Tran Mai, D’Este Elisa, Roberti Julia, Koch Birgit, Xue Lin, Johnsson Kai. A General Strategy to Develop Cell Permeable and Fluorogenic Probes for Multicolour Nanoscopy. *Nature Chemistry*. 2020, 12(2):165–172.
- [69] Zhang Jie, Shi Heng, Huang Chen, Mei Le, Guo Qiang, Cheng Ke, Wu Pingzhou, Su Dan, Chen Qingxin, Gan Shenglong, Wing Chan Cecilia Ka, Shi Jiahai, Chen Jian Lin, Jonathan Choi Chung Hang, Yao Shao Q., Chen Xian Kai, Tang Ben Zhong, He Jufang, Sun Hongyan. De Novo Designed Self-Assembling Rhodamine Probe for Real-Time, Long-Term and Quantitative Live-Cell Nanoscopy.

ACS Nano. 2023, 17(4):3632–3644.

- [70] Tyson Jonathan, Hu Kevin, Zheng Shuai, Kidd Phylicia, Dadina Neville, Chu Ling, Toomre Derek, Bewersdorf Joerg, Schepartz Alanna. Extremely Bright, Near-IR Emitting Spontaneously Blinking Fluorophores Enable Ratiometric Multicolor Nanoscopy in Live Cells. *ACS Central Science*. 2021, 7(8):1419–1426.
- [71] Bucevičius Jonas, Kostiuk Georgij, Gerasimaitė Rūta, Gilat Tanja, Lukinavičius Gražvydas. Enhancing the Biocompatibility of Rhodamine Fluorescent Probes by a Neighbouring Group Effect. *Chemical Science*. 2020, 11(28):7313–7323.
- [72] Bucevičius Jonas, Gerasimaitė Rūta, Kiszka Kamila A., Pradhan Shalini, Kostiuk Georgij, Koenen Tanja, Lukinavičius Gražvydas. A General Highly Efficient Synthesis of Biocompatible Rhodamine Dyes and Probes for Live-Cell Multicolor Nanoscopy. *Nature Communications*. 2023, 14(1):1–14.
- [73] Jiang Gangwei, Ren Tian Bing, D’Este Elisa, Xiong Mengyi, Xiong Bin, Johnsson Kai, Zhang Xiao Bing, Wang Lu, Yuan Lin. A Synergistic Strategy to Develop Photostable and Bright Dyes with Long Stokes Shift for Nanoscopy. *Nature Communications*. 2022, 13(1):1–10.
- [74] Wang Lei G, Montaño Antonio R, Combs Jason R, McMahon Nathan P, Solanki Allison, Gomes Michelle M, Tao Kai, Bisson William H, Szafran Dani A, Samkoe Kimberley S, Tichauer Kenneth M, Gibbs Summer L. OregonFluor Enables Quantitative Intracellular Paired Agent Imaging to Assess Drug Target Availability in Live Cells and Tissues. *Nature Chemistry*. 2023, 15(5):729–739.
- [75] Grimm Jonathan B., Tkachuk Ariana N., Xie Liangqi, Choi Heejun, Mohar Boaz, Falco Natalie, Schaefer Kathy, Patel Ronak, Zheng Qinsi, Liu Zhe, Lippincott-Schwartz Jennifer, Brown Timothy A., Lavis Luke D. A General Method to Optimize and Functionalize Red-Shifted Rhodamine Dyes. *Nature Methods*. 2020, 17(8):815–821.
- [76] Wang Bowen, Xiong Michael, Susanto Josephine, Li Xue, Leung Wai-Yee, Xu Ke. Transforming Rhodamine Dyes for (d)STORM Super-Resolution Microscopy via 1,3-Disubstituted Imidazolium Substitution. *Angewandte Chemie International Edition*. 2022, 61(9):e202113612.
- [77] Grimm Florian, Rehman Jasmin, Stoldt Stefan, Khan Taukeer A., Schlötel Jan Gero, Nizamov Shamil, John Michael, Belov Vladimir N., Hell Stefan W. Rhodamines with a Chloronicotinic Acid Fragment for Live Cell Superresolution STED Microscopy. *Chemistry - A European Journal*. 2021, 27(19):6070–6076.
- [78] Remmel Michael, Scheiderer Lukas, Butkevich Alexey N, Bossi Mariano L, Hell Stefan W. Accelerated MINFLUX Nanoscopy, through Spontaneously Fast-Blinking Fluorophores. *Small*. 2023, 19(12):2206026.
- [79] Lincoln Richard, Bossi Mariano L., Remmel Michael, D’Este Elisa, Butkevich Alexey N., Hell Stefan W. A General Design of Caging-Group-Free Photoactivatable Fluorophores for Live-Cell Nanoscopy. *Nature Chemistry*. 2022, 14(9):1013–1020.
- [80] Gong Qingbao, Zhang Xinfu, Li Wanwan, Guo Xing, Wu Qinghua, Yu Changjiang, Jiao Lijuan, Xiao Yi, Hao Erhong. Long-Wavelength Photoconvertible Dimeric BODIPYs for Super-Resolution Single-Molecule Localization Imaging in Near-Infrared Emission. *Journal of the American Chemical Society*. 2022, 144(48):21992–21999.
- [81] Altman Roger B, Terry Daniel S, Zhou Zhou, Zheng Qinsi, Geggier Peter, Kolster Rachel A, Zhao Yongfang, Javitch Jonathan A, Warren J David, Blanchard Scott C. Cyanine Fluorophore Derivatives with Enhanced Photostability. *Nature Methods*. 2012, 9(1):68–71.
- [82] Roubinet Benoît, Bischoff Matthias, Nizamov Shamil, Yan Sergey, Geisler Claudia, Stoldt Stefan, Mitronova Gyuzel Y, Belov Vladimir N, Bossi Mariano L, Hell Stefan W. Photoactivatable Rhodamine Spiroamides and Diazoketones Decorated with “Universal Hydrophilizer” or Hydroxyl Groups. *The Journal of Organic Chemistry*. 2018, 83(12):6466–6476.

- [83] Werther Philipp, Yserentant Klaus, Braun Felix, Grußmayer Kristin, Navikas Vytautas, Yu Miao, Zhang Zhibin, Ziegler Michael J., Mayer Christoph, Gralak Antoni J., Busch Marvin, Chi Weijie, Rominger Frank, Radenovic Aleksandra, Liu Xiaogang, Lemke Edward A., Buckup Tiago, Herten Dirk Peter, Wombacher Richard. Bio-Orthogonal Red and Far-Red Fluorogenic Probes for Wash-Free Live-Cell and Super-Resolution Microscopy. *ACS Central Science*. 2021, 7(9):1561–1571.
- [84] Tinnefeld Philip, Cordes Thorben. “Self-Healing” Dyes: Intramolecular Stabilization of Organic Fluorophores. *Nature Methods*. 2012, 9(5):426–427.
- [85] Pati Avik K., El Bakouri Ouissam, Jockusch Steffen, Zhou Zhou, Altman Roger B., Fitzgerald Gabriel A., Asher Wesley B., Terry Daniel S., Borgia Alessandro, Holsey Michael D., Batchelder Jake E., Abeywickrama Chathura, Huddle Brandt, Rufa Dominic, Javitch Jonathan A., Ottosson Henrik, Blanchard Scott C. Tuning the Baird Aromatic Triplet-State Energy of Cyclooctatetraene to Maximize the Self-Healing Mechanism in Organic Fluorophores. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2020, 117(39):24305–24315.
- [86] Zhang Lei, Isselstein Michael, Köhler Jens, Eleftheriadis Nikolaos, Huisjes Nadia M, Guirao-Ortiz Miguel, Narducci Alessandra, Smit Jochem H, Stoffels Janko, Harz Hartmann, Leonhardt Heinrich, Herrmann Andreas, Cordes Thorben. Linker Molecules Convert Commercial Fluorophores into Tailored Functional Probes during Biolabelling. *Angewandte Chemie International Edition*. 2022, 61(19):e202112959.
- [87] Zhang Yuan, Yang Chen, Peng Sijia, Ling Jing, Chen Peng, Ma Yumiao, Wang Wenjuan, Chen Zhixing, Chen Chunlai. General Strategy To Improve the Photon Budget of Thiol-Conjugated Cyanine Dyes. *Journal of the American Chemical Society*. 2023, 145(7):4187–4198.
- [88] Los Georgyi V, Encell Lance P, McDougall Mark G, Hartzell Danette D, Karassina Natasha, Zimprich Chad, Wood Monika G, Learish Randy, Ohana Rachel Friedman, Urh Marjeta, Simpson Dan, Mendez Jacqui, Zimmerman Kris, Otto Paul, Vidugiris Gediminas, Zhu Ji, Darzins Aldis, Klaubert Dieter H, Bulleit Robert F, Wood Keith V. HaloTag: A Novel Protein Labeling Technology for Cell Imaging and Protein Analysis. *ACS Chemical Biology*. 2008, 3(6):373–382.
- [89] Keppler Antje, Gendreizig Susanne, Gronemeyer Thomas, Pick Horst, Vogel Horst, Johnsson Kai. A General Method for the Covalent Labeling of Fusion Proteins with Small Molecules in Vivo. *Nature Biotechnology*. 2003, 21(1):86–89.
- [90] Glogger Marius, Wang Dongni, Kompa Julian, Balakrishnan Ashwin, Hiblot Julien, Barth Hans Dieter, Johnsson Kai, Heilemann Mike. Synergizing Exchangeable Fluorophore Labels for Multitarget STED Microscopy. *ACS Nano*. 2022, 16(11):17991–17997.
- [91] Frei Michelle S, Tarnawski Miroslaw, Roberti M Julia, Koch Birgit, Hiblot Julien, Johnsson Kai. Engineered HaloTag Variants for Fluorescence Lifetime Multiplexing. *Nature Methods*. 2022, 19(1):65–70.
- [92] Kompa Julian, Bruins Jorick, Glogger Marius, Wilhelm Jonas, Frei Michelle S., Tarnawski Miroslaw, D’Este Elisa, Heilemann Mike, Hiblot Julien, Johnsson Kai. Exchangeable HaloTag Ligands for Super-Resolution Fluorescence Microscopy. *Journal of the American Chemical Society*. 2023, 145(5):3075–3083.
- [93] Holtmannspötter Michael, Wienbeuker Eike, Dellmann Timo, Watrinet Isabelle, Garcia-Sáez Ana J, Johnsson Kai, Kurre Rainer, Piehler Jacob. Reversible Live-Cell Labeling with Retro-Engineered HaloTags Enables Long-Term High- and Super-Resolution Imaging. *Angewandte Chemie International Edition*. 2023, 62(18):e202219050.
- [94] Wilhelm Jonas, Kuhn Stefanie, Tarnawski Miroslaw, Gotthard Guillaume, Tunnermann Jana, Tanzer Timo, Karpenko Julie, Mertes Nicole, Xue Lin, Uhrig Ulrike, Reinstein Jochen, Hiblot Julien, Johnsson Kai. Kinetic and Structural Characterization of the Self-Labeling Protein Tags HaloTag7, SNAP-Tag, and CLIP-Tag. *Biochemistry*. 2021, 60(33):2560–2575.
- [95] Huang Bo, Wang Wenqin, Bates Mark, Zhuang Xiaowei. Three-Dimensional Super-Resolution

- Imaging by Stochastic Optical Reconstruction Microscopy. *Science*. 2008, 319(5864):810–813.
- [96] Juette Manuel F., Gould Travis J., Lessard Mark D., Mlodzianoski Michael J., Nagpure Bhupendra S., Bennett Brian T., Hess Samuel T., Bewersdorf Joerg. Three-Dimensional Sub-100 Nm Resolution Fluorescence Microscopy of Thick Samples. *Nature Methods*. 2008, 5(6):527–529.
- [97] Pavani Sri Rama Prasanna, Thompson Michael A., Biteen Julie S., Lord Samuel J., Liu Na, Twieg Robert J., Piestun Rafael, Moerner W E. Three-Dimensional, Single-Molecule Fluorescence Imaging beyond the Diffraction Limit by Using a Double-Helix Point Spread Function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009, 106(9):2995–2999.
- [98] Nehme Elias, Freedman Daniel, Gordon Racheli, Ferdman Boris, Weiss Lucien E., Alalouf Onit, Naor Tal, Orange Reut, Michaeli Tomer, Shechtman Yoav. DeepSTORM3D: Dense 3D Localization Microscopy and PSF Design by Deep Learning. *Nature Methods*. 2020, 17(7):734–740.
- [99] Speiser Artur, Müller Lucas Raphael, Hoess Philipp, Matti Ulf, Obara Christopher J., Legant Wesley R., Kreshuk Anna, Macke Jakob H., Ries Jonas, Turaga Srinivas C. Deep Learning Enables Fast and Dense Single-Molecule Localization with High Accuracy. *Nature Methods*. 2021, 18(9):1082–1090.
- [100] Zhang Peiyi, Liu Sheng, Chaurasia Abhishek, Ma Donghan, Mlodzianoski Michael J., Culurciello Eugenio, Huang Fang. Analyzing Complex Single-Molecule Emission Patterns with Deep Learning. *Nature Methods*. 2018, 15(11):913–916.
- [101] Xu Fan, Ma Donghan, MacPherson Kathryn P., Liu Sheng, Bu Ye, Wang Yu, Tang Yu, Bi Cheng, Kwok Tim, Chubykin Alexander A., Yin Peng, Calve Sarah, Landreth Gary E., Huang Fang. Three-Dimensional Nanoscopy of Whole Cells and Tissues with in Situ Point Spread Function Retrieval. *Nature Methods*. 2020, 17(5):531–540.
- [102] Klevanski Maja, Herrmannsdoerfer Frank, Sass Steffen, Venkataramani Varun, Heilemann Mike, Kuner Thomas. Automated Highly Multiplexed Super-Resolution Imaging of Protein Nano-Architecture in Cells and Tissues. *Nature Communications*. 2020, 11(1):1552.
- [103] Lampe André, Tadeus Georgi, Schmoranzer Jan. Spectral Demixing Avoids Registration Errors and Reduces Noise in Multicolor Localization-Based Super-Resolution Microscopy. *Methods and Applications in Fluorescence*. 2015, 3(3):34006.
- [104] Kim Taehwan, Moon Seonah, Xu Ke. Information-Rich Localization Microscopy through Machine Learning. *Nature Communications*. 2019, 10(1):1996.
- [105] Churchman L Stirling, Spudich James A. Colocalization of Fluorescent Probes: Accurate and Precise Registration with Nanometer Resolution. *Cold Spring Harbor protocols*. 2012, 2012(2):141–149.
- [106] Churchman L Stirling, Spudich James A. Single-Molecule High-Resolution Colocalization of Single Probes. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2012, 2012(2):pdb.prot067926.
- [107] Goshtasby Ardeshir. Image Registration by Local Approximation Methods. *Image and Vision Computing*. 1988, 6(4):255–261.
- [108] Babcock Hazen P, Zhuang Xiaowei. Analyzing Single Molecule Localization Microscopy Data Using Cubic Splines. *Scientific Reports*. 2017, 7(1):552.
- [109] Uno Shin-nosuke, Kamiya Mako, Yoshihara Toshitada, Sugawara Ko, Okabe Kohki, Tarhan Mehmet C, Fujita Hiroyuki, Funatsu Takashi, Okada Yasushi, Tobita Seiji, Urano Yasutera. A Spontaneously Blinking Fluorophore Based on Intramolecular Spirocyclization for Live-Cell Super-Resolution Imaging. *Nature Chemistry*. 2014, 6681–689.
- [110] Zheng Qinsi, Ayala Anthony X, Chung Inhee, Weigel Aubrey V, Ranjan Anand, Falco Natalie, Grimm Jonathan B, Tkachuk Ariana N, Wu Carl, Lippincott-Schwartz Jennifer, Singer Robert H, Lavis Luke D. Rational Design of Fluorogenic and Spontaneously Blinking Labels for Super-Resolution Imaging. *ACS Central Science*. 2019, 5(9):1602–1613.

- [111] Uno Shin-nosuke, Kamiya Mako, Morozumi Akihiko, Urano Yasuteru. A Green-Light-Emitting, Spontaneously Blinking Fluorophore Based on Intramolecular Spirocyclization for Dual-Colour Super-Resolution Imaging. *Chemical Communications*. 2018, 54(1):102–105.
- [112] Morozumi Akihiko, Kamiya Mako, Uno Shin Nosuke, Umezawa Keitaro, Kojima Ryosuke, Yoshihara Toshitada, Tobita Seiji, Urano Yasuteru. Spontaneously Blinking Fluorophores Based on Nucleophilic Addition/Dissociation of Intracellular Glutathione for Live-Cell Super-Resolution Imaging. *Journal of the American Chemical Society*. 2020, 142(21):9625–9633.
- [113] Macdonald Patrick J, Gayda Susan, Haack Richard A, Ruan Qiaoqiao, Himmelsbach Richard J, Tetin Sergey Y. Rhodamine-Derived Fluorescent Dye with Inherent Blinking Behavior for Super-Resolution Imaging. *Analytical Chemistry*. 2018, 90(15):9165–9173.
- [114] Werther Philipp, Yserentant Klaus, Braun Felix, Kaltwasser Nicolai, Popp Christoph, Baalmann Mathis, Herten Dirk Peter, Wombacher Richard. Live-Cell Localization Microscopy with a Fluorogenic and Self-Blinking Tetrazine Probe. *Angewandte Chemie International Edition*. 2020, 59(2):804–810.
- [115] Liu Zengjin, Zheng Ying, Xie Ting, Chen Zihan, Huang Zhenlong, Ye Zhiwei, Xiao Yi. Clickable Rhodamine Spirolactam Based Spontaneously Blinking Probe for Super-Resolution Imaging. *Chinese Chemical Letters*. 2021, 32(12):3862–3864.
- [116] Chi Weijie, Qiao Qinglong, Wang Chao, Zheng Jiazhu, Zhou Wei, Xu Ning, Wu Xia, Jiang Xiao, Tan Davin, Xu Zhaochao, Liu Xiaogang. Descriptor Δ GC-O Enables the Quantitative Design of Spontaneously Blinking Rhodamines for Live-Cell Super-Resolution Imaging. *Angewandte Chemie International Edition*. 2020, 59(45):20215–20223.
- [117] Ye Zhiwei, Yu Haibo, Yang Wei, Zheng Ying, Li Ning, Bian Hui, Wang Zechen, Liu Qiang, Song Youtao, Zhang Mingyan, Xiao Yi. Strategy to Lengthen the On-Time of Photochromic Rhodamine Spirolactam for Super-Resolution Photoactivated Localization Microscopy. *Journal of the American Chemical Society*. 2019, 141(16):6527–6536.
- [118] Sage Daniel, Kirshner Hagai, Pengo Thomas, Stuurman Nico, Min Junhong, Manley Suliana, Unser Michael. Quantitative Evaluation of Software Packages for Single-Molecule Localization Microscopy. *Nature Methods*. 2015, 12(8):717–724.
- [119] Gallagher Patrick G. Disorders of Erythrocyte Hydration. *Blood*. 2017, 130(25):2699–2708.
- [120] Hamidi Mehrdad, Tajerzadeh Hosnieh. Carrier Erythrocytes: An Overview. *Drug Delivery: Journal of Delivery and Targeting of Therapeutic Agents*. 2003, 10(1):9–20.
- [121] Chien Shu, Usami Shunichi, Dellenback Robert J, Gregersen Magnus I. Blood Viscosity: Influence of Erythrocyte Deformation. *Science*. 1967, 157(3790):827–829.
- [122] Correa Catalina, Rodríguez Javier, Prieto Signed, Álvarez Luisa, Ospino Benjamín, Munévar Ángela, Bernal Pedro, Mora Jessica, Vitery Sarith. Geometric Diagnosis of Erythrocyte Morphophysiology: Geometric Diagnosis of Erythrocyte. *Journal of Medicine and Medical Sciences*. 2012, 3(11):715–720.
- [123] Smith J E. Erythrocyte Membrane: Structure, Function, and Pathophysiology. *Veterinary Pathology*. 1987, 24(6):471–476.
- [124] de Oliveira Sofia, Saldanha Carlota. An Overview about Erythrocyte Membrane. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*. 2010, 4463–74.
- [125] Gallagher Patrick G. Abnormalities of the Erythrocyte Membrane. *Pediatric Clinics*. 2013, 60(6):1349–1362.
- [126] Pan Leiting, Yan Rui, Li Wan, Xu Ke. Super-Resolution Microscopy Reveals the Native Ultrastructure of the Erythrocyte Cytoskeleton. *Cell Reports*. 2018, 22(5):1151–1158.
- [127] Rasnik Ivan, McKinney Sean A, Ha Taekjip. Nonblinking and Long-Lasting Single-Molecule Fluorescence Imaging. *Nature Methods*. 2006, 3(11):891–893.

- [128] Loudet Aurore, Burgess Kevin. BODIPY Dyes and Their Derivatives: Syntheses and Spectroscopic Properties. *Chemical Reviews*. 2007, 107(11):4891–4932.
- [129] Yan Rui, Chen Kun, Xu Ke. Probing Nanoscale Diffusional Heterogeneities in Cellular Membranes through Multidimensional Single-Molecule and Super-Resolution Microscopy. *Journal of the American Chemical Society*. 2020, 142(44):18866–18873.
- [130] Wijesooriya Chamari S, Peterson Julie A, Shrestha Pradeep, Gehrmann Elizabeth J, Winter Arthur H, Smith Emily A. A Photoactivatable BODIPY Probe for Localization-Based Super-Resolution Cellular Imaging. *Angewandte Chemie International Edition*. 2018, 57(39):12685–12689.
- [131] Zhang Yang, Song Ki-Hee, Tang Sicheng, Ravelo Laura, Cusido Janet, Sun Cheng, Zhang Hao F, Raymo Francisco M. Far-Red Photoactivatable BODIPYs for the Super-Resolution Imaging of Live Cells. *Journal of the American Chemical Society*. 2018, 140(40):12741–12745.
- [132] Ye Zhiwei, Yang Wei, Wang Chao, Zheng Ying, Chi Weijie, Liu Xiaogang, Huang Zhenlong, Li Xiaoyuan, Xiao Yi. Quaternary Piperazine-Substituted Rhodamines with Enhanced Brightness for Super-Resolution Imaging. *Journal of the American Chemical Society*. 2019, 141(37):14491–14495.
- [133] Danylchuk Dmytro I, Moon Seonah, Xu Ke, Klymchenko Andrey S. Switchable Solvatochromic Probes for Live-Cell Super-Resolution Imaging of Plasma Membrane Organization. *Angewandte Chemie International Edition*. 2019, 58(42):14920–14924.
- [134] Dodge James T., Mitchell Carolyn, Hanahan Donald J. The Preparation and Chemical Characteristics of Hemoglobin-Free Ghosts of Human Erythrocytes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1963, 100(1):119–130.
- [135] Banterle Niccolò, Bui Khanh Huy, Lemke Edward A, Beck Martin. Fourier Ring Correlation as a Resolution Criterion for Super-Resolution Microscopy. *Journal of Structural Biology*. 2013, 183(3):363–367.
- [136] Nieuwenhuizen Robert P J, Lidke Keith A, Bates Mark, Puig Daniela Leyton, Grünwald David, Stallinga Sjoerd, Rieger Bernd. Measuring Image Resolution in Optical Nanoscopy. *Nature Methods*. 2013, 10(6):557–562.
- [137] Stuart J. Erythrocyte Rheology. *Journal of Clinical Pathology*. 1985, 38(9):965–977.
- [138] Fletcher G L. The Effects of Capture, “Stress,” and Storage of Whole Blood on the Red Blood Cells, Plasma Proteins, Glucose, and Electrolytes of the Winter Flounder (*Pseudopleuronectes Americanus*). *Canadian Journal of Zoology*. 1975, 53(2):197–206.
- [139] Choi Jeong-Mo, Holehouse Alex S, Pappu Rohit V. Physical Principles Underlying the Complex Biology of Intracellular Phase Transitions. *Annual Review of Biophysics*. 2020, 49(1):107–133.
- [140] Bezlyepkina N., Gracià R. S., Shchelokovskyy P., Lipowsky R., Dimova R. Phase Diagram and Tie-Line Determination for the Ternary Mixture DOPC/ESM/Cholesterol. *Biophysical Journal*. 2013, 104(7):1456–1464.
- [141] 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. *中国科学: 化学*. 2017, 47(8):926–932.
- [142] Banala Sambashiva, Maurel Damien, Manley Suliana, Johnsson Kai. A Caged, Localizable Rhodamine Derivative for Superresolution Microscopy. *ACS Chemical Biology*. 2012, 7(2):289–293.
- [143] Grimm Jonathan B., Klein Teresa, Kopek Benjamin G., Shtengel Gleb, Hess Harald F., Sauer Markus, Lavis Luke D. Synthesis of a Far-Red Photoactivatable Silicon-Containing Rhodamine for Super-Resolution Microscopy. *Angewandte Chemie International Edition*. 2016, 128(5):1755–1759.
- [144] Belov Vladimir N., Wurm Christian A., Boyarskiy Vadim P., Jakobs Stefan, Hell Stefan W. Rhodamines NN: A Novel Class of Caged Fluorescent Dyes. *Angewandte Chemie International Edition*. 2010, 49(20):3520–3523.
- [145] Wäldchen Sina, Lehmann Julian, Klein Teresa, van de Linde Sebastian, Sauer Markus. Light-

Induced Cell Damage in Live-Cell Super-Resolution Microscopy. *Scientific Reports*. 2015, 5(1):15348.

- [146] He Haihong, Ye Zhiwei, Zheng Ying, Xu Xiu, Guo Chunlei, Xiao Yi, Yang Wei, Qian Xuhong, Yang Youjun. Super-Resolution Imaging of Lysosomes with a Nitroso-Caged Rhodamine. *Chemical Communications*. 2018, 54(23):2842–2845.
- [147] He Haihong, Ye Zhiwei, Xiao Yi, Yang Wei, Qian Xuhong, Yang Youjun. Super-Resolution Monitoring of Mitochondrial Dynamics upon Time-Gated Photo-Triggered Release of Nitric Oxide. *Analytical Chemistry*. 2018, 90(3):2164–2169.
- [148] Fridman A L, Mukhametshin F M, Novikov Sergei S. Advances in the Chemistry of Aliphatic N-Nitrosamines. *Russian Chemical Reviews*. 1971, 40(1):34–50.
- [149] Vorobev Aleksey Yu, Moskalensky Alexander E. Long-Wavelength Photoremoveable Protecting Groups: On the Way to in Vivo Application. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 2020, 18:27–34.
- [150] Blackman Melissa L, Royzen Maksim, Fox Joseph M. Tetrazine Ligation: Fast Bioconjugation Based on Inverse-Electron-Demand Diels–Alder Reactivity. *Journal of The American Chemical Society*. 2008, 130(41):13518–13519.
- [151] Holtzer Laurent, Meckel Tobias, Schmidt Thomas. Nanometric Three-Dimensional Tracking of Individual Quantum Dots in Cells. *Applied Physics Letters*. 2007, 90(5):10–13.
- [152] Wang Yong, Fruhwirth Gilbert, Cai En, Ng Tony, Selvin Paul R. 3D Super-Resolution Imaging with Blinking Quantum Dots. *Nano Letters*. 2013, 13(11):5233–5241.
- [153] Otto Pia, Bergmann Stephan, Sandmeyer Alice, Dirksen Maxim, Wrede Oliver, Hellweg Thomas, Huser Thomas. Resolving the Internal Morphology of Core-Shell Micogels with Super-Resolution Fluorescence Microscopy. *Nanoscale Advances*. 2020, 2(1):323–331.
- [154] Liu Wenliang, Yu Fenglei, Yang Jianbo, Xiang Bo, Xiao Peng, Wang Li. 3D Single-Molecule Imaging of Transmembrane Signaling by Targeting Nanodiamonds. *Advanced Functional Materials*. 2016, 26(3):365–375.
- [155] Casey Joseph R, Grinstein Sergio, Orlowski John. Sensors and Regulators of Intracellular PH. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2010, 11(1):50–61.
- [156] Yu Haibo, Zhang Xinfu, Xiao Yi, Zou Wei, Wang Liping, Jin Liji. Targetable Fluorescent Probe for Monitoring Exogenous and Endogenous NO in Mitochondria of Living Cells. *Analytical chemistry*. 2013, 85(15):7076–7084.

致谢

感谢国家自然科学基金青年项目(22004011),中国博士后科学基金博新计划(BX20200073)及博士后基金面上项目(2020M670754)对本文工作的支持。

感谢博士后在站期间合作导师彭孝军院士与肖义教授对本人工作提供的大量协助与支持。彭老师为本人完成相关研究提供了思想启发和实验平台,肖义教授为本文的工作质量提升倾注了大量心血,两位老师的学术风骨和科研探索精神是引领本人克服困难向前迈进的引领性旗帜。

感谢国科温州研究院杨薇研究员与大连理工大学物理与光电子工程学院李睿老师对于三维超分辨成像光学设计和开发给予的协助,感谢杨老师在第四章工作中红细胞实验及写作上倾注的大量时间,杨老师是第四章发表工作共同的第一作者。这部分内容的微流控芯片设计与开发均由杨老师完成,本文仅做介绍和展示。

感谢满慧子博士,李宏旭、张雪研究生,感谢与你们共同的学术探索;同时,感谢课题组内所有的研究生,很荣欣有机会与你们一同工作。

最后,特别感谢郑莹博士对本文合成及成像工作的支撑贡献,她也是本文第三章、第五章工作完成的真正幕后英雄。同时,郑莹也是本人的妻子,因为你,我克服了无数个科研上的困难,你给予了我力量,让我面对一个又一个挑战,你是我生命的支撑和依靠。

博士生期间发表的学术论文，专著

- [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. *中国科学: 化学*, 2017, 47(8):926-932. 中文核心期刊
- [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. *Journal of the American Chemical Society*, 2019, 141(16):6527–6536. (*SCI* 检索号: 000466053400017)
- [3] **Ye Zhiwei**, Yang Wei, Wang Chao, et al. Quaternary Piperazine-Substituted Rhodamines with Enhanced Brightness for Super-Resolution Imaging. *Journal of the American Chemical Society*, 2019, 141(37):14491–14495. (*SCI* 检索号: 000487180200004)
- [4] **Ye Zhiwei**, Xiao Yi, Guo Haiying, et al. Specific and Photostable Rhodamine-Based Tracker for 3D Video Imaging of Single Acidic Organelles. *RSC Advances*, 2014, 4(71):37547–37555. (*SCI* 检索号: 000341454600013)
- [5] He Haihong, **Ye Zhiwei**(共同一作), Zheng Ying, et al. Super-Resolution Imaging of Lysosomes with a Nitroso-Caged Rhodamine. *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. *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. *Chemical Communications*, 2019, 55(13):1951–1954. (*SCI* 检索号: 000458390000016)

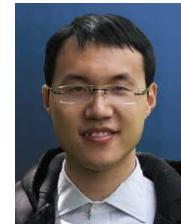
博士后期间发表的学术论文，专著

- [1] Zheng Ying, Ye Zhiwei(共同一作, 共同通讯), Zhang Xue, Xiao Yi. Recruiting Rate Determines the Blinking Propensity of Rhodamine Fluorophores for Super-Resolution Imaging. *Journal of the American Chemical Society* 2023, 145(9):5125–5133. (*SCI*检索号: 000937155700001) (本文第三章)
- [2] Zheng Ying, Ye Zhiwei(共同一作, 共同通讯), Xiao Yi. Subtle Structural Translation Magically Modulates the Super-Resolution Imaging of Self-Blinking Rhodamines. *Analytical Chemistry* 2023, 95(8):4172-4179. (*SCI*检索号: 000941996700001) (本文第三章部分内容)
- [3] Ye Zhiwei, Yang Wei, Zheng Ying, Wang Shujing, Zhang Xiaodong, Yu Haibo, Li Shuangshuang, Luo Chunxiong, Peng Xiaojun, Xiao Yi. Integrating a Far-Red Fluorescent Probe with a Microfluidic Platform for Super-Resolution Imaging of Live Erythrocyte Membrane Dynamics. *Angewandte Chemie International Edition* 2022, 61(45):e202211540. (*SCI*检索号: 000866118900001) (本文第四章)
- [4] Zheng Ying, Ye Zhiwei(共同一作, 共同通讯), Liu Zengjin, Yang Wei, Zhang Xinfu, Yang Youjun, Xiao Yi. Nitroso-Caged Rhodamine: A Superior Green Light-Activatable Fluorophore for Single-Molecule Localization Super-Resolution Imaging. *Analytical Chemistry* 2021, 93(22):7833–7842. (*SCI*检索号: 000661465300010) (本文第五章)
- [5] Ye Zhiwei, Zheng Ying, Peng Xiaojun, Xiao Yi. Surpassing the Background Barrier for Multidimensional Single-Molecule Localization Super-Resolution Imaging: A Case of Lysosome-Exclusively Turn-on Probe. *Analytical Chemistry* 2022, 94(22):7990–7995. (*SCI*检索号: 000818973600001) (本文第六章)
- [6] Man Huizi, Bian Hui, Zhang Xinfu, Wang Chao, Huang Zhenlong, Yan Yu, Ye Zhiwei(共同通讯), Xiao Yi. Hybrid Labeling System for DSTORM Imaging of Endoplasmic Reticulum for Uncovering Ultrastructural Transformations under Stress Conditions. *Biosensors and Bioelectronics* 2021, 189:113378. (*SCI*检索号: 000663573600001)
- [7] Man Huizi, Zhou Lin, Zhu Guanghao, Zheng Ying, Ye Zhiwei(共同通讯), Huang Zhenlong, Teng Xinru, Ai Chunzhi, Ge Guangbo, Xiao Yi. Super-Resolution Imaging of Autophagy by a Preferred Pair of Self-Labeling Protein Tags and Fluorescent Ligands. *Analytical Chemistry* 2022, 94(43):15057–15066. (*SCI*检索号: 000879041500001)
- [8] Liu Zengjin, Zheng Ying, Xie Ting, Chen Zihan, Huang Zhenlong, Ye Zhiwei(共同通讯), Xiao Yi. Clickable Rhodamine Spirolactam Based Spontaneously Blinking Probe for Super-Resolution Imaging. *Chinese Chemical Letters* 2021, 32(12):3862–3864. (*SCI*检索号: 000771784000028)

个人简历

叶智伟 博士

153-8217-0998 | yezhiwei@dlut.edu.cn | 1990 年 10 月
大连理工大学精细化工国家重点实验室 E216 | <https://yezhiwei90.github.io/>



教育职业经历

大连理工大学 (2007-2011)	应用化学 (精细化工)	学士
大连理工大学 (2011-2020)	应用化学 导师:肖义教授	博士
大连理工大学 (2020-今)	化学 合作导师:彭孝军院士、肖义教授	博士后

研究内容

本人研究方向是先进光学成像技术的发展及其适配超分辨荧光染料的开发, 研究主要通过染料、光子、统计、计算机、生物学等多学科交叉融合实现。

超分辨成像染料研究, 在荧光染料研究相关的延长单分子亮态时长及提升染料亮度分子设计策略有重要创新 (JACS, 2019; JACS, 2019; Angew. Chem., Int. Ed. 2022): 特别针对罗丹明类染料单分子性能的缺陷, 发展具有 ~ 70 ms 持续亮态时长的甘氨酸罗丹明, 以及为抑制罗丹明染料非辐射跃迁过程, 开发了超亮季铵化哌嗪罗丹明, 其荧光量子产率可接近 ~ 1 ; 发展同时满足单分子定位和追踪的红外氟硼吡咯类染料, 将红细胞膜诊断推向分子尺度, 这是目前国内外超分辨成像荧光染料研究领域中报道的极佳的、原创性的研究成果。

先进光学成像研究, 在超分辨显微镜成像维度开发上具有深厚的基础, 在单分子数学分析方法上有突破: 针对单分子定位显微镜缺乏轴向维度的情况, 从基础硬件改造出发, 软硬件协同发展具有多维度成像能力的超分辨显微镜, 其纵向分辨率达到 10 nm, 轴向分辨率可达到 40 nm; 针对染料领域缺乏单分子荧光分析方法, 通过滤波、空间聚类等数学模型, 创制一种具有自主知识产权的数据分析工具, 利用这些基础工具的搭建和完善, 深度挖掘荧光染料的单分子特征。

研究基础

荧光显微成像研究

- 积累 >400 h 的单分子定位超分辨成像经验, 成像分辨率可达 ~ 20 nm。
- 建立了单分子定位超分辨成像数据和单分子分析数学方法, 并基于 Matlab 开发了高通量适用的成像数据处理软件。已有超过 20 种染料的单分子分析比较数据结果, 及多种超分辨成像数据深度分析方法。
- 对荧光显微镜硬件改造, 协同软件分析方法搭建, 发展多色及三维超分辨成像显微镜。

荧光染料研究

- 为超分辨成像染料开发了两种分子设计策略, 可实现罗丹明染料亮度提升, 以及罗丹明螺内酰亚胺染料亮态时间延长。
- 拥有 >30 种罗丹明染料的单分子研究经验, 掌握了罗丹明、氟硼吡咯和菁染料在不同成像环境下的单分子特征。

永久通信地址

首要电子邮箱: ye.zhi.wei@foxmail.com

次要电子邮箱: yezhiwei@dlut.edu.cn

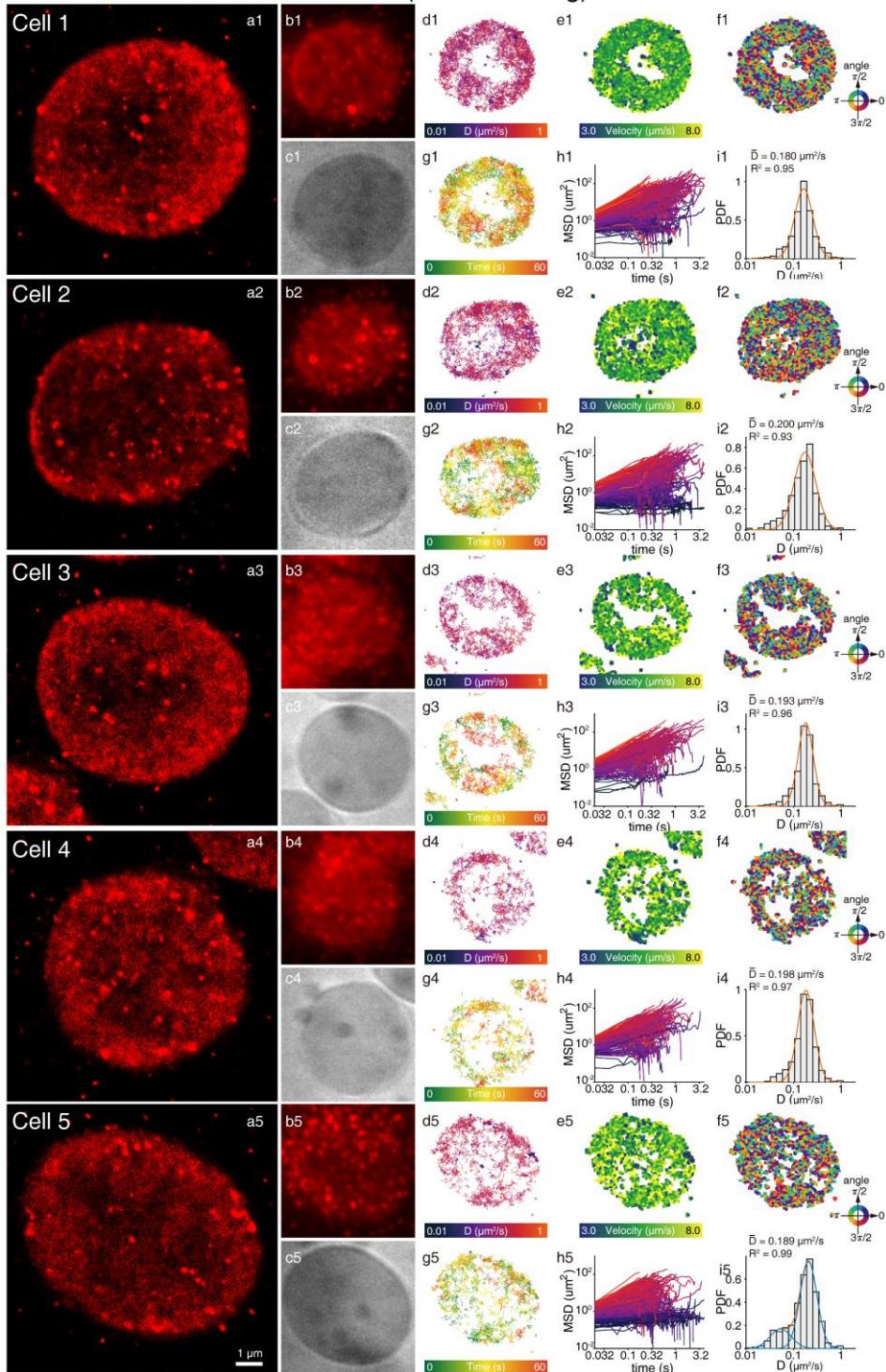
附录

A 高通量的红细胞膜分子诊断研究

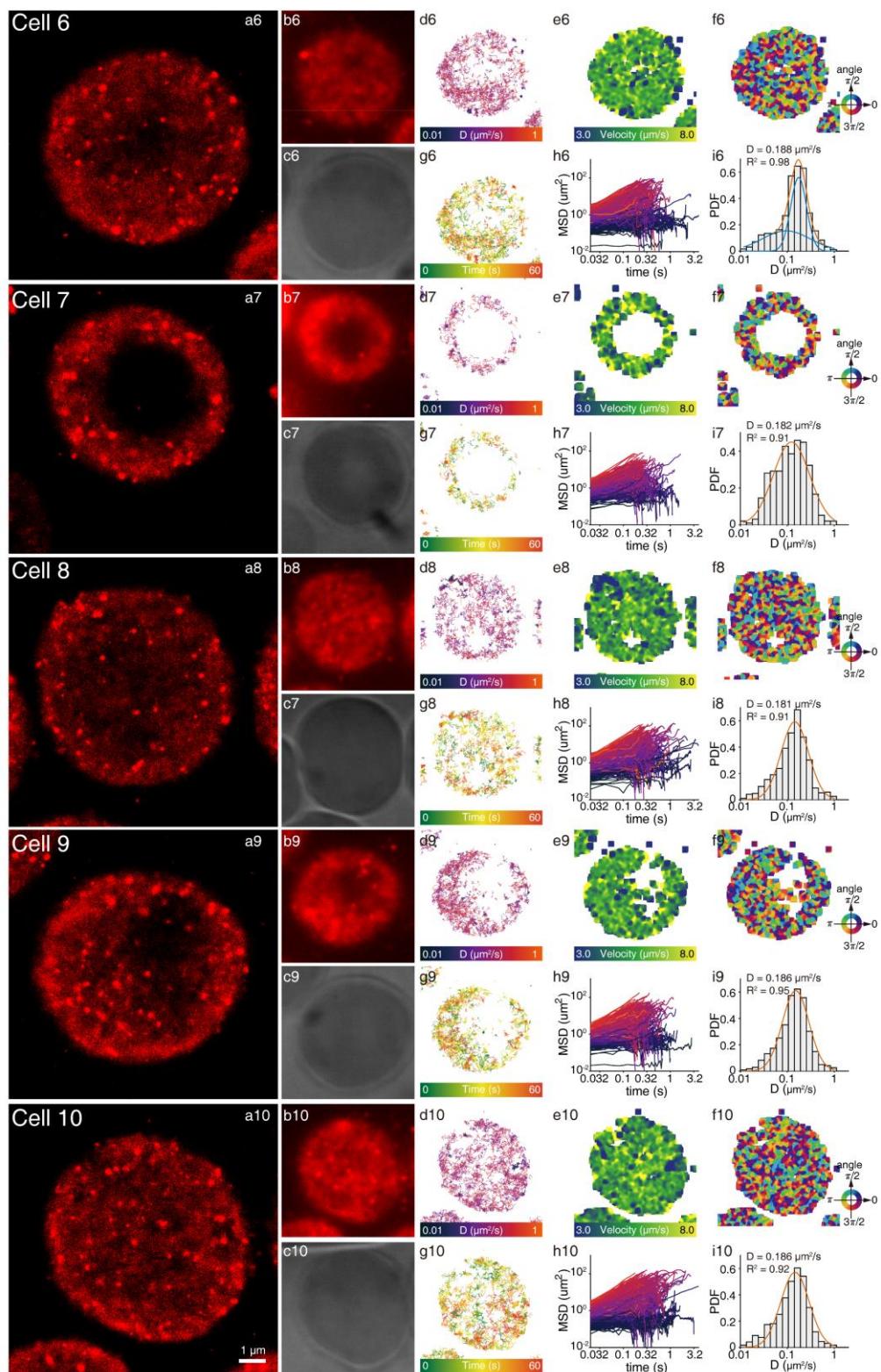
附录 A

高通量红细胞膜分子诊断研究

Cell 1-10: Normal red blood cells (310 mOsm/kg)

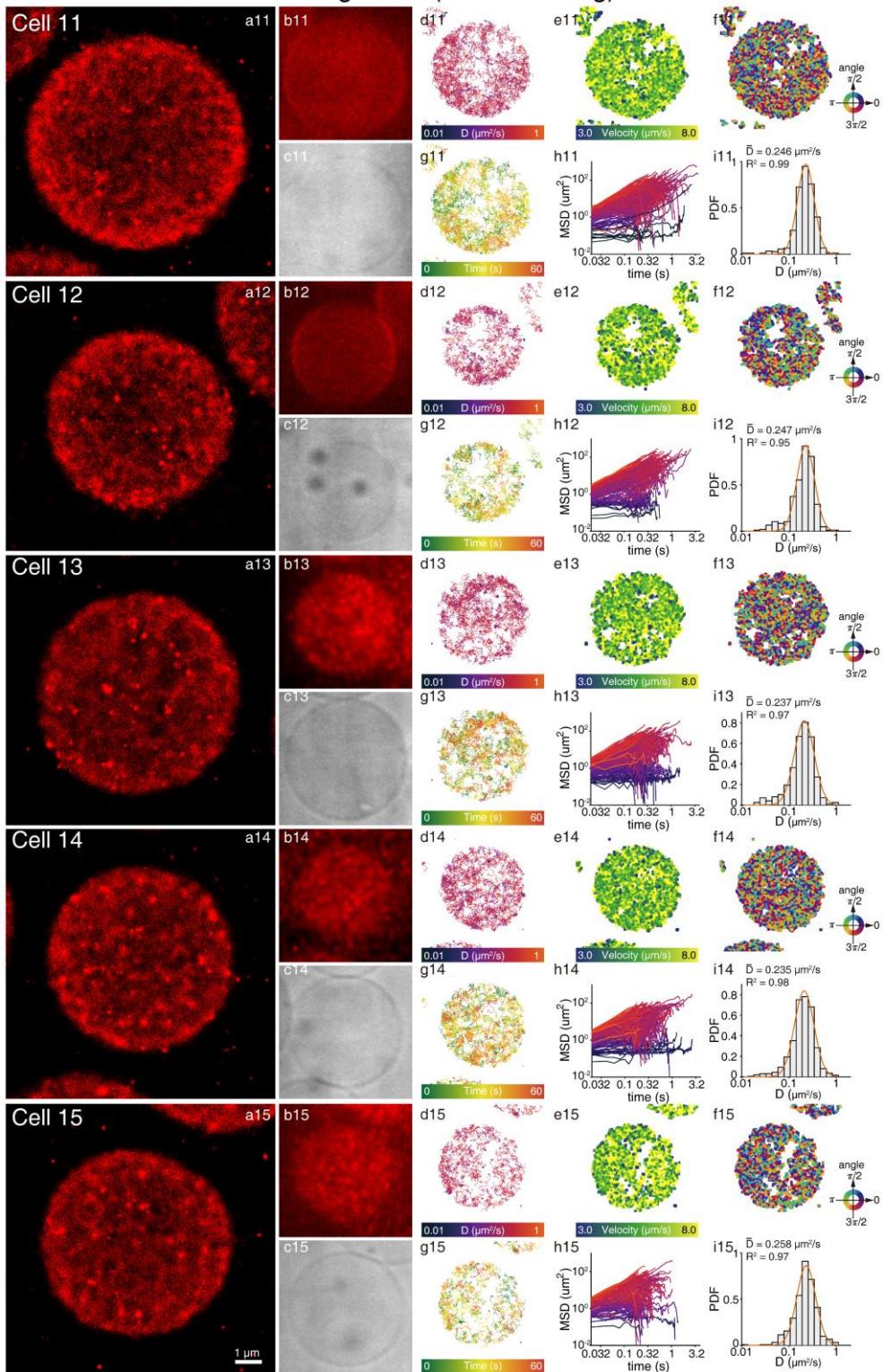


(续图)



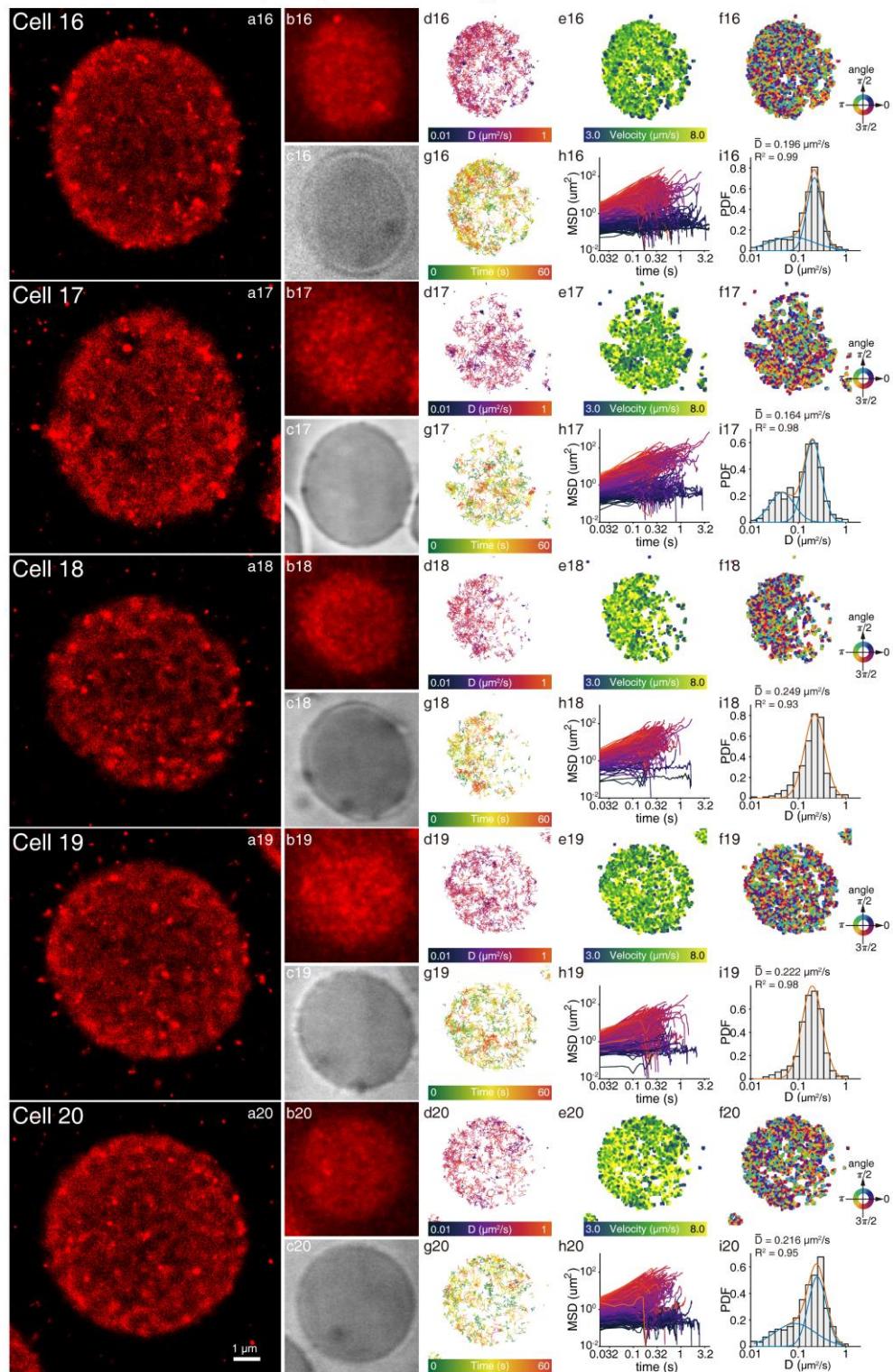
(续图)

Cell 11-15: Red blood cell “ghosts” (143 mOsm/kg)



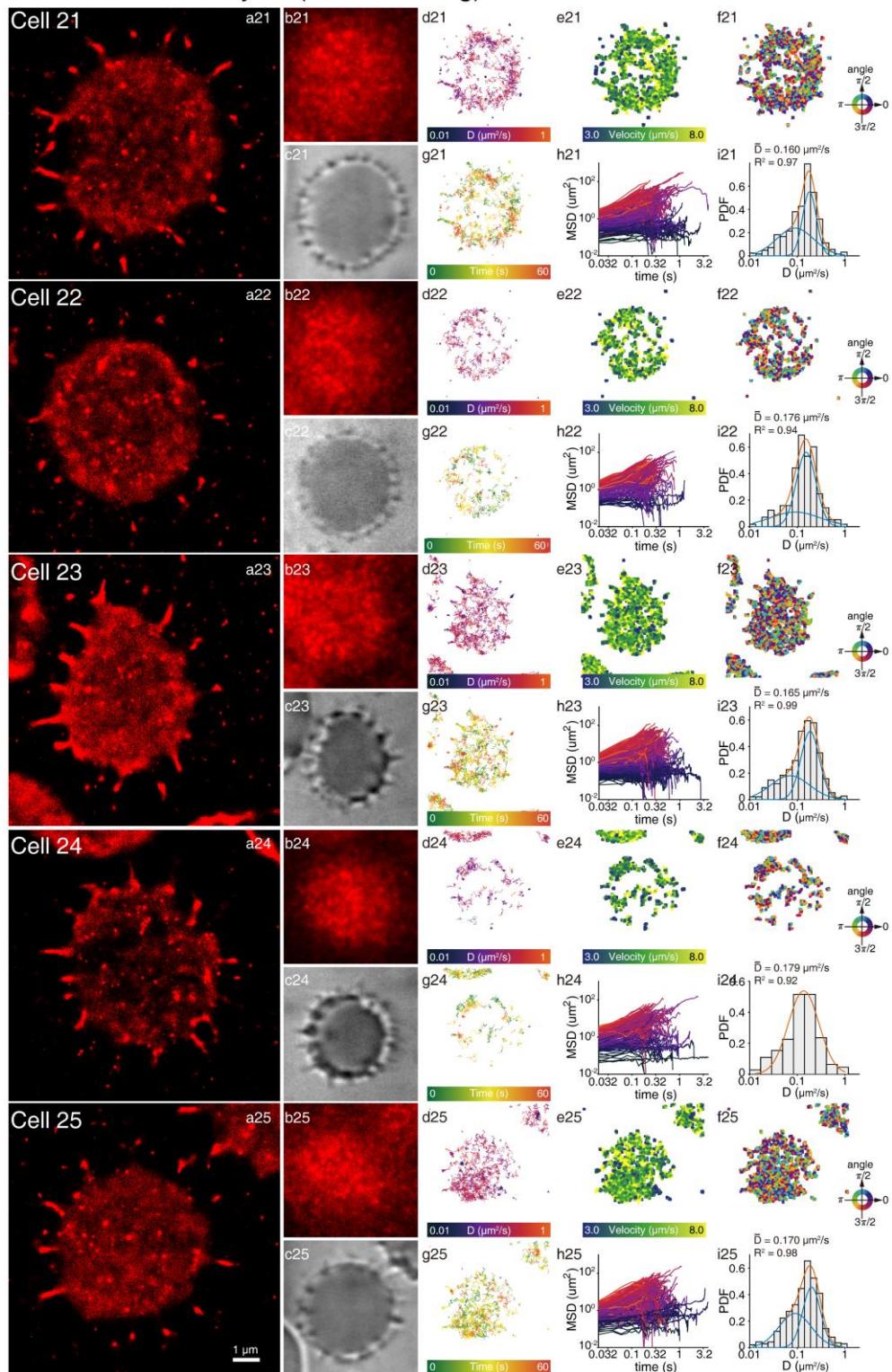
(续图)

Cell 16-20: Stomatocytes (251 mOsm/kg)



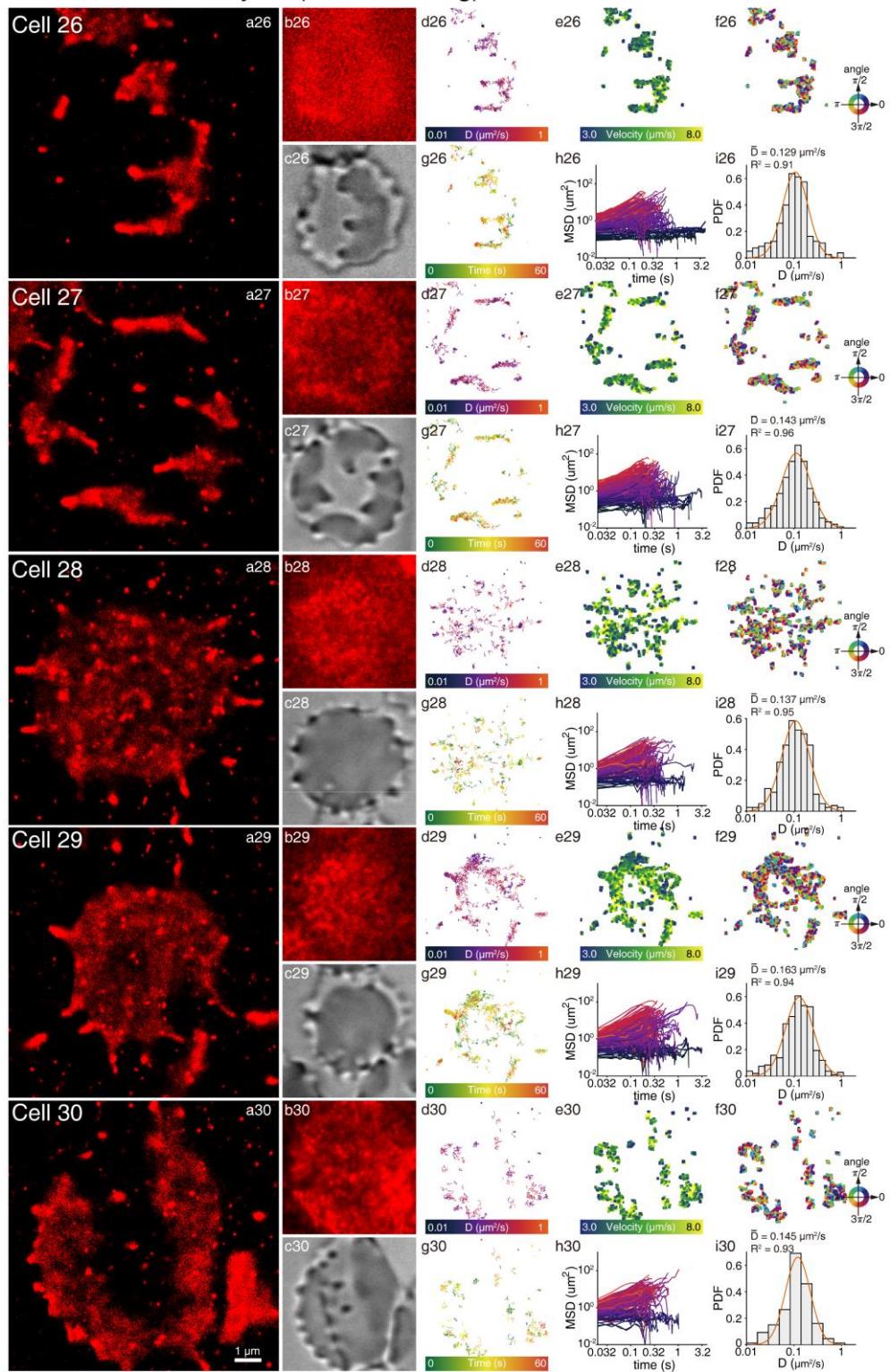
(续图)

Cell 21-25: Echinocytes (381 mOsm/kg)



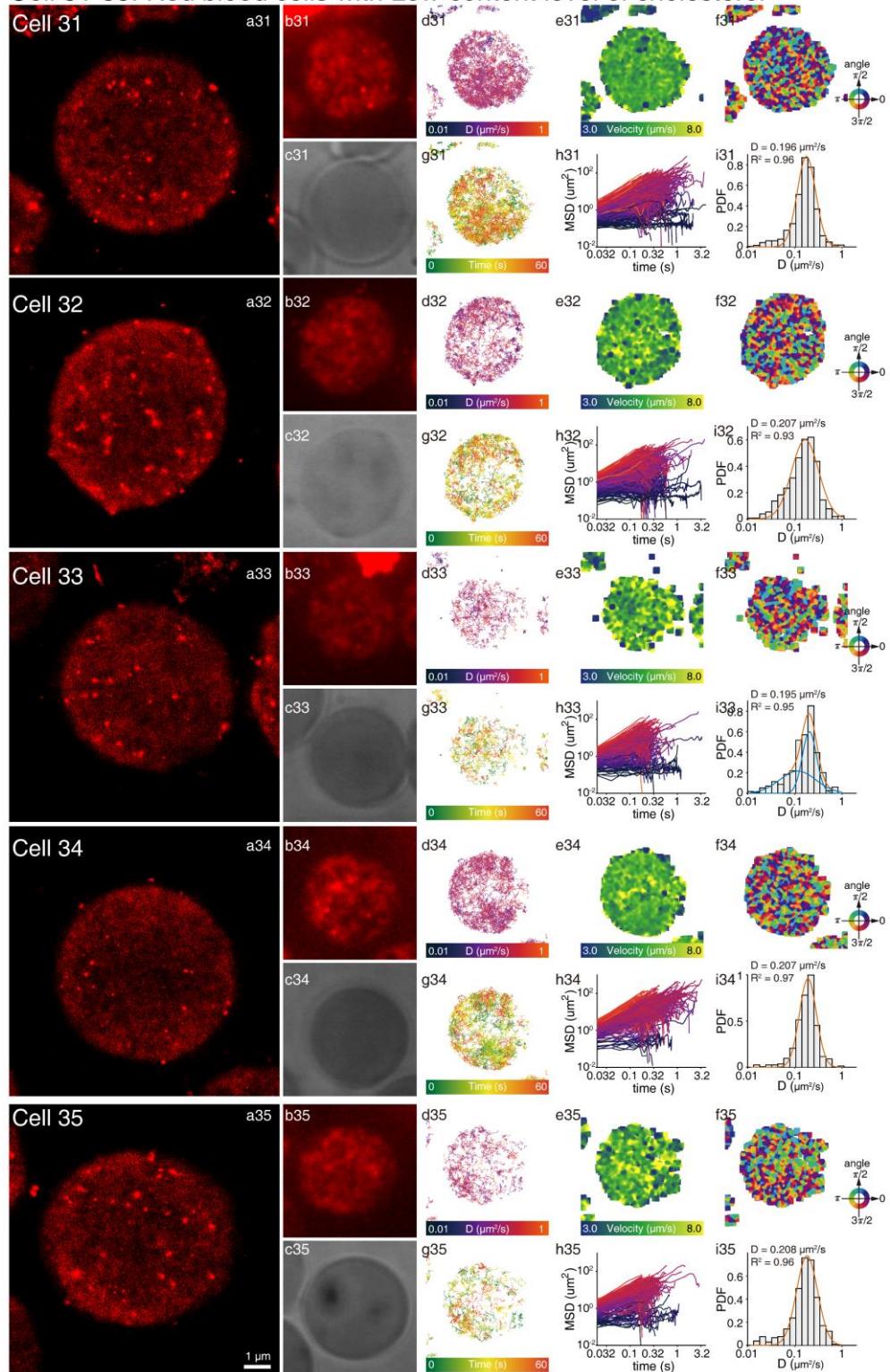
(续图)

Cell 26-30: Echinocytes (466 mOsm/kg)



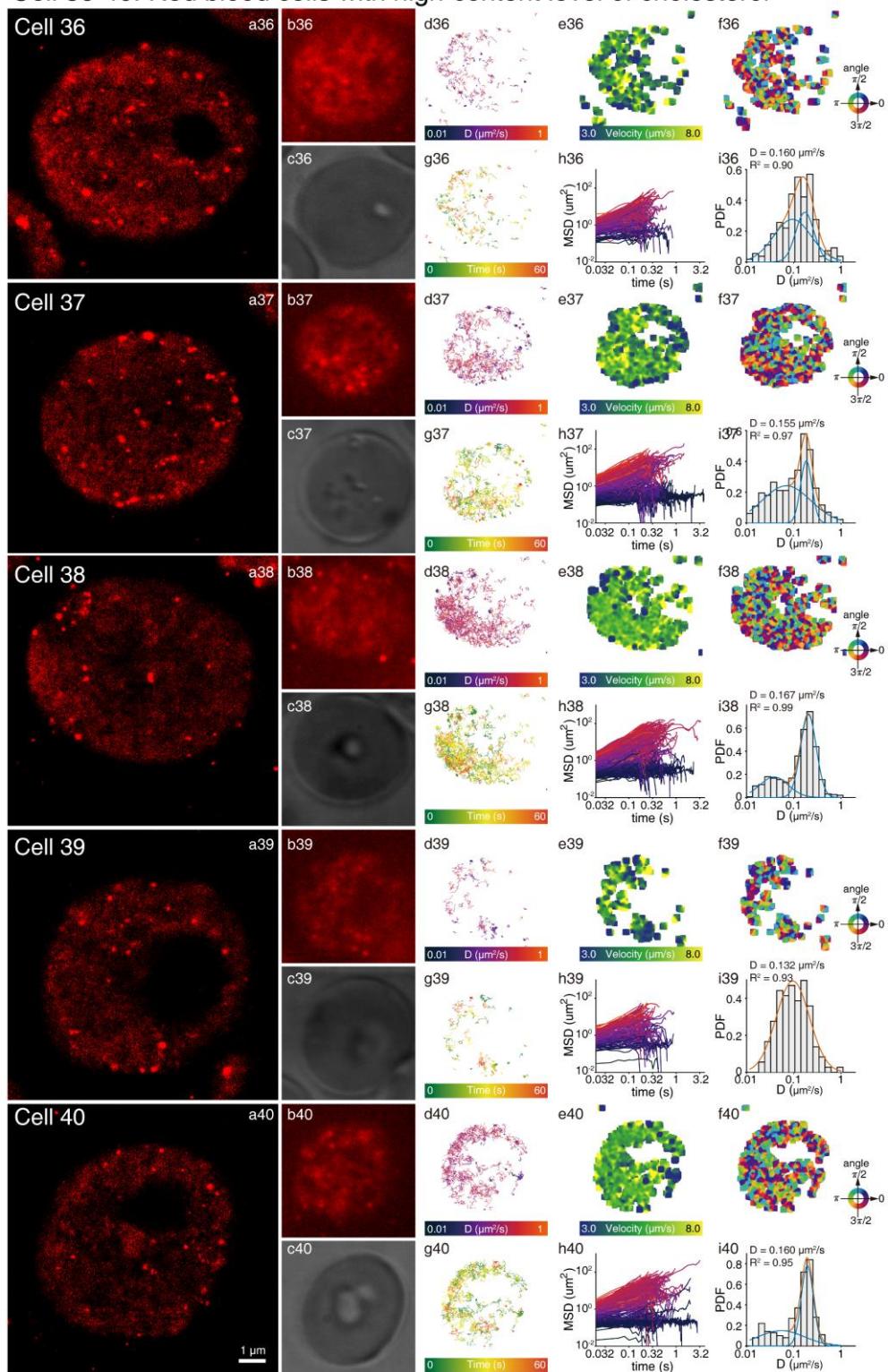
(续图)

Cell 31-35: Red blood cells with Low-content level of cholesterol



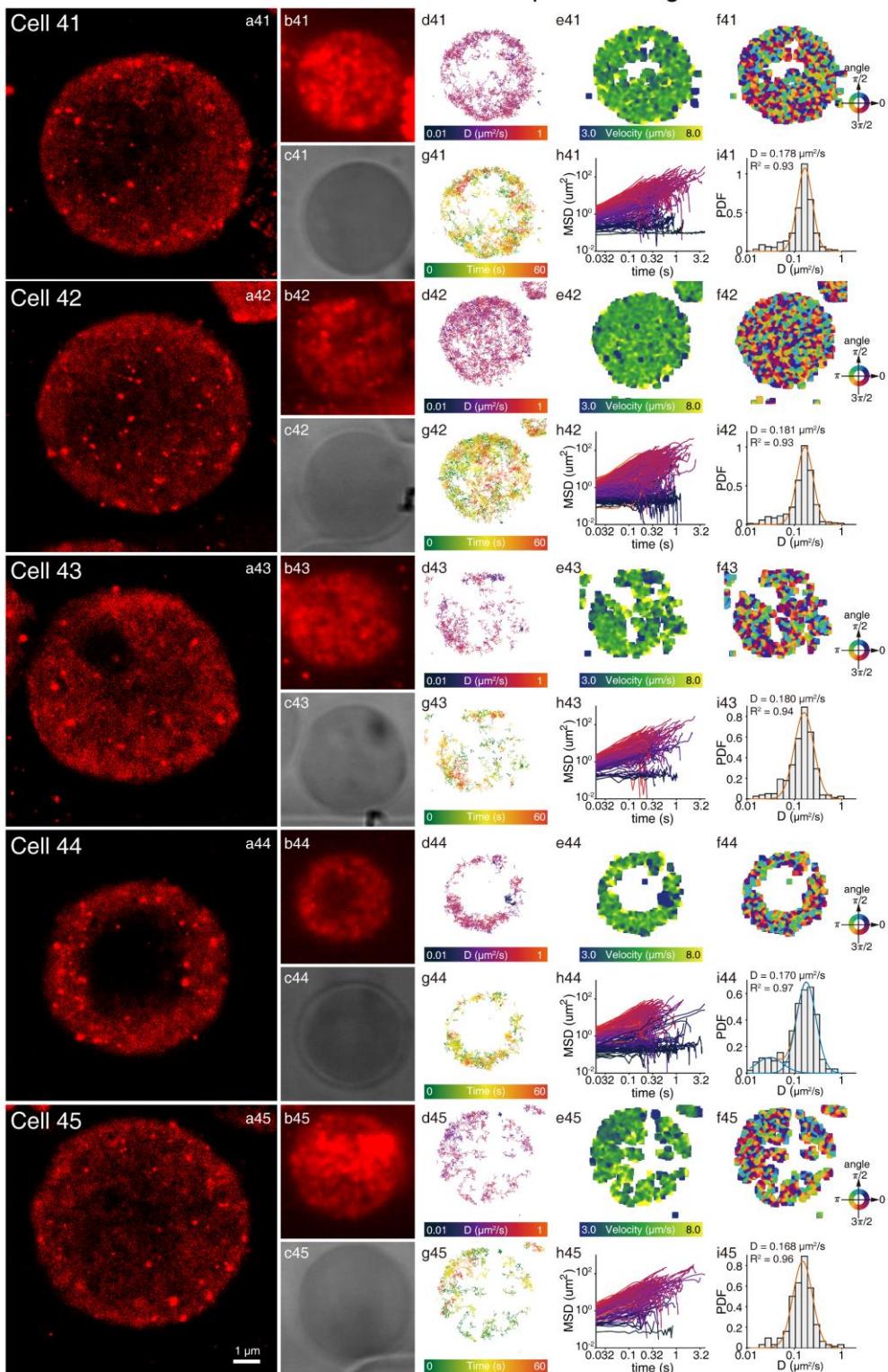
(续图)

Cell 36-40: Red blood cells with high-content level of cholesterol



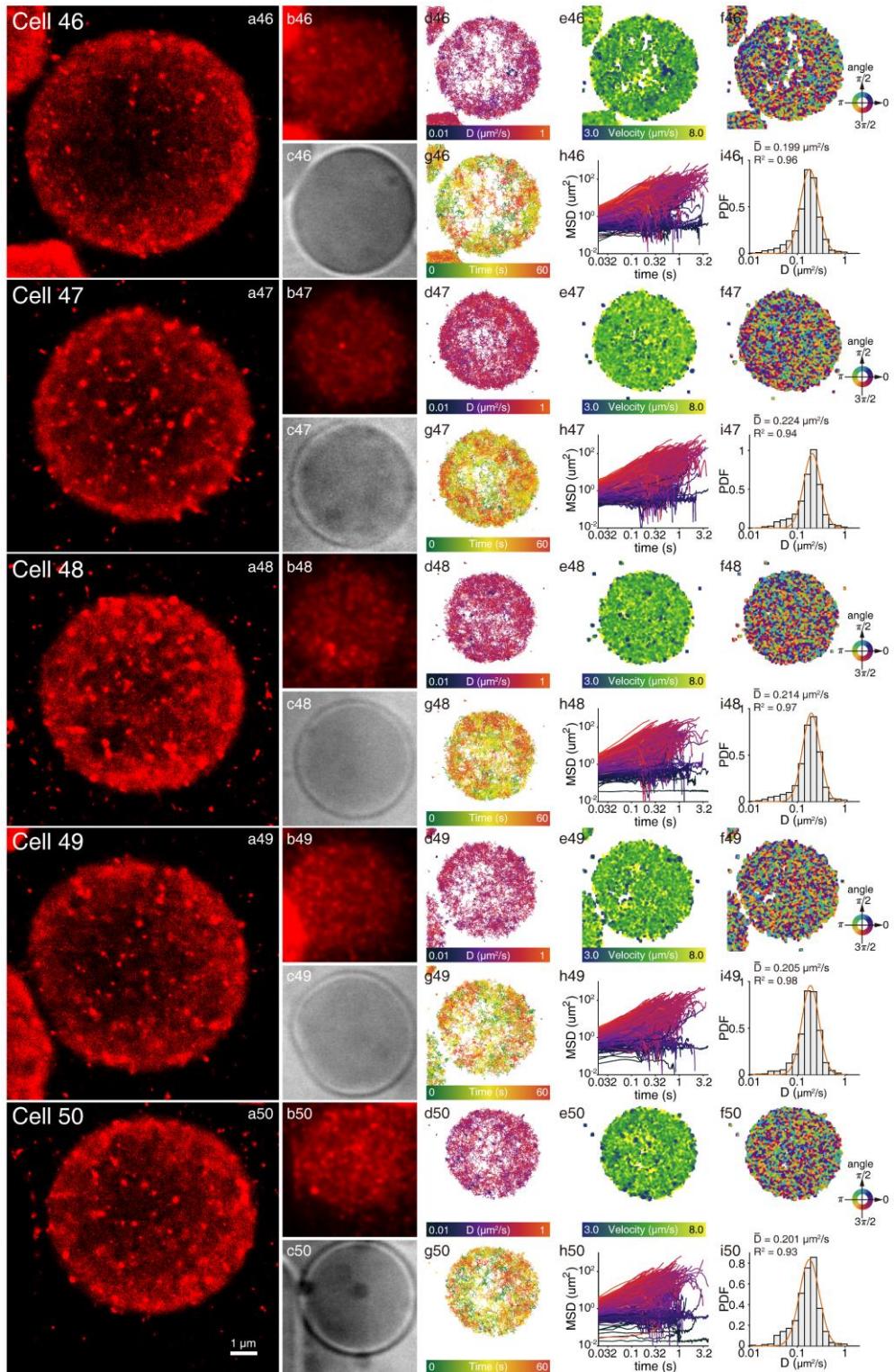
(续图)

Cell 41-45: Red blood cells after membrane proteins degradation



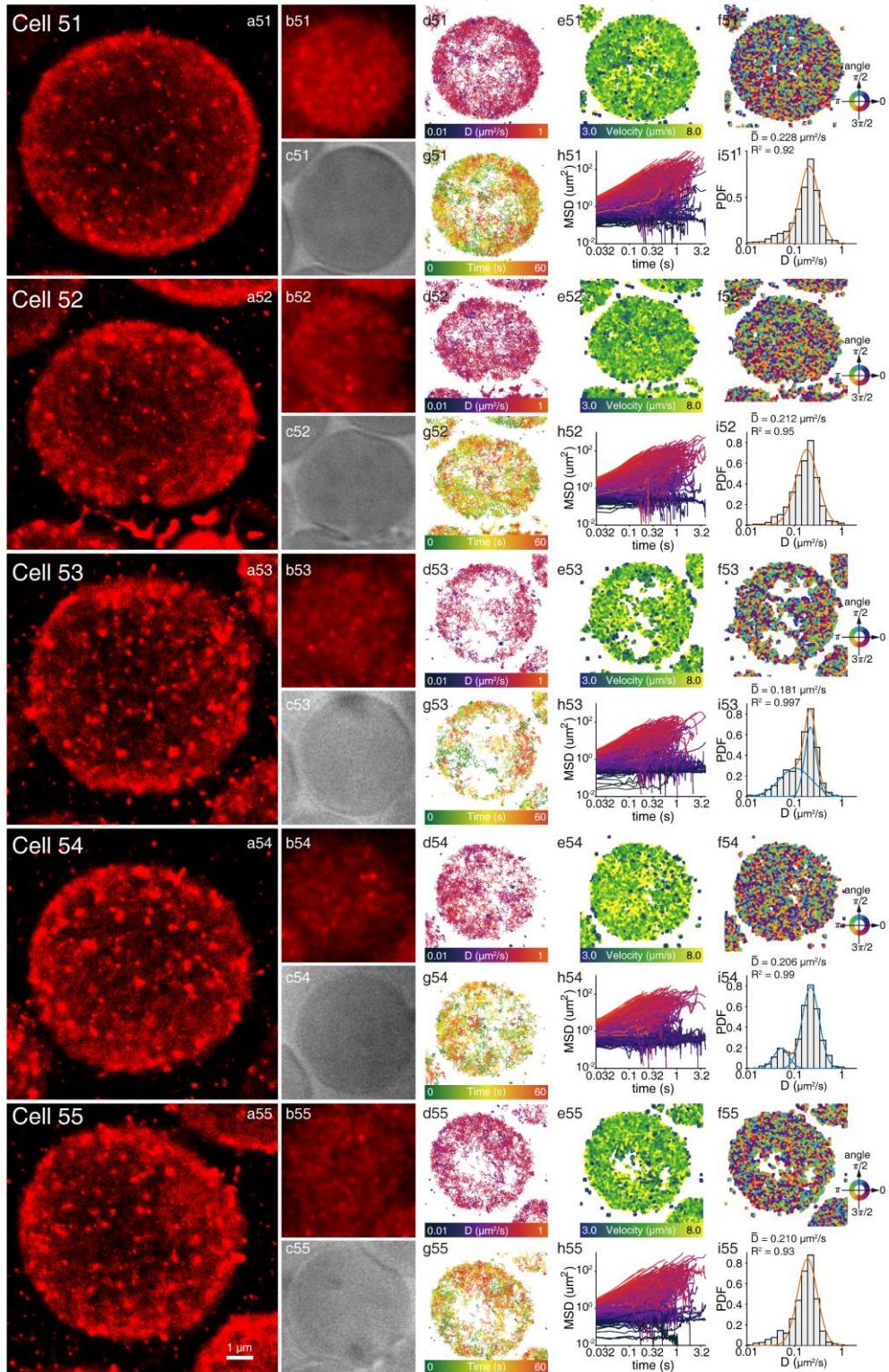
(续图)

Cell 46-50: RBCs incubated with Senicapoc



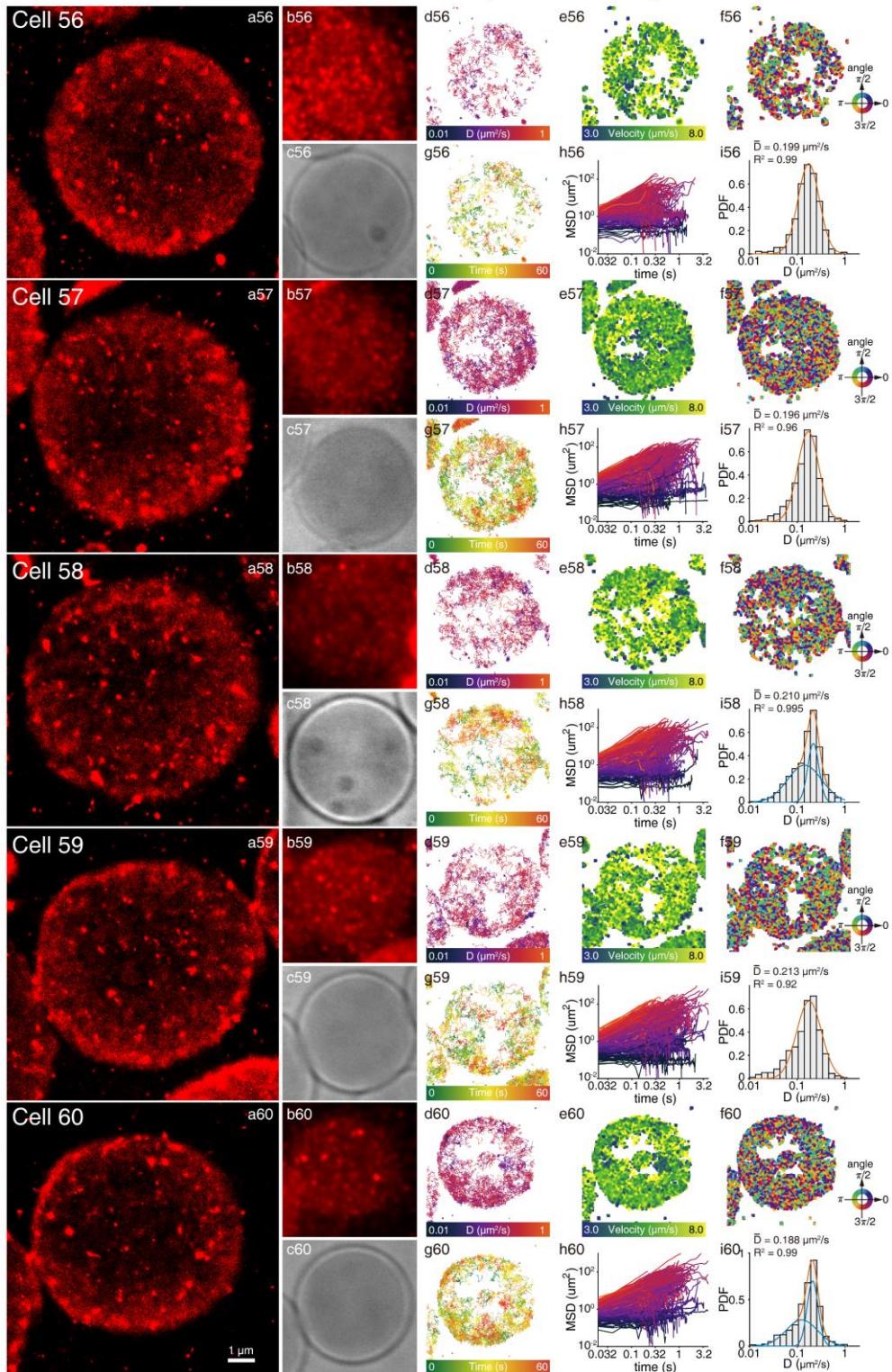
(续图)

Cell 51-55: RBCs incubated with Senicapoc and Pb^{2+} ($t = 0-1$ h)



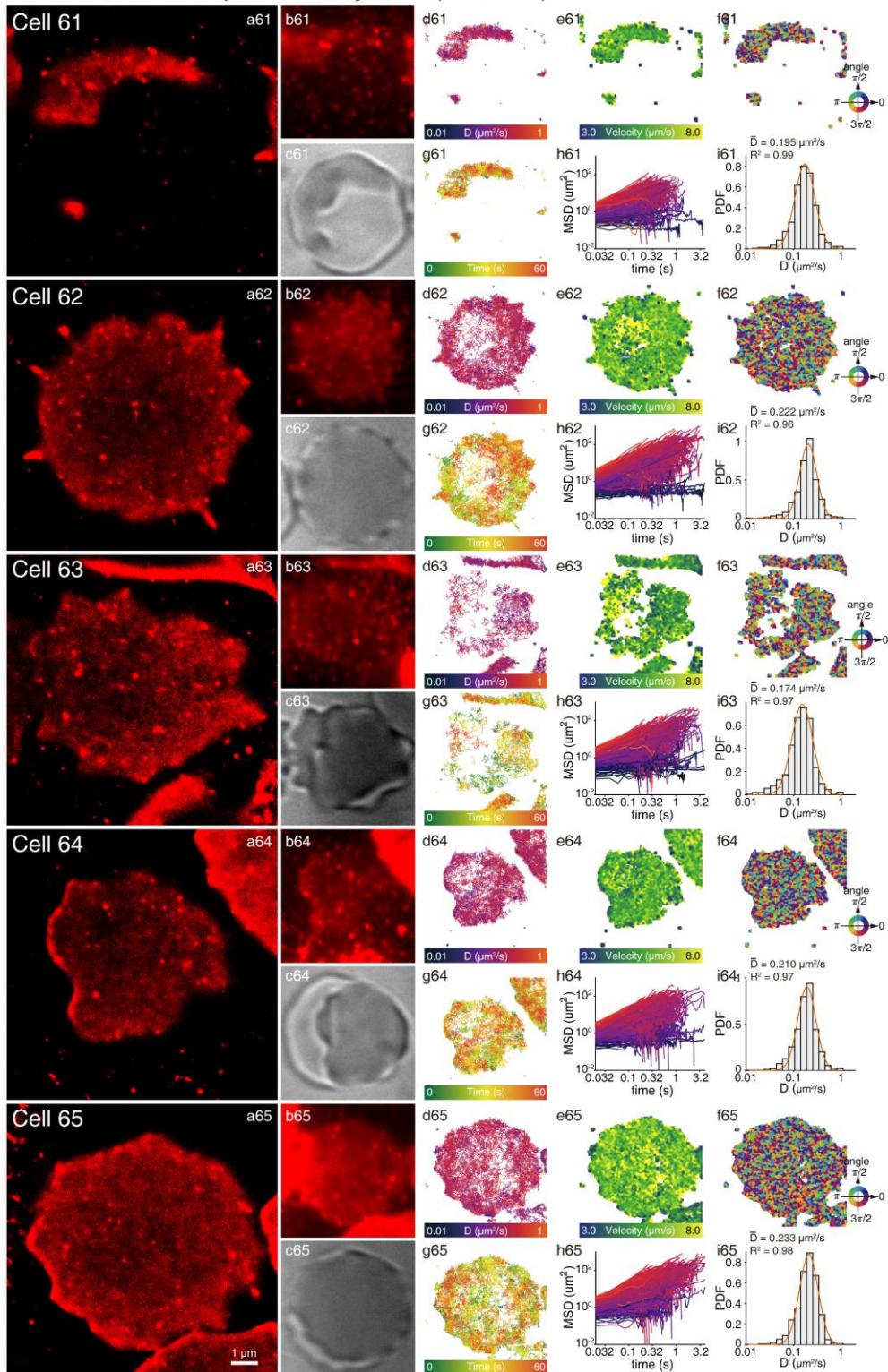
(续图)

Cell 56-60: RBCs incubated with Senicapoc and Pb^{2+} ($t = 1-2 \text{ h}$)



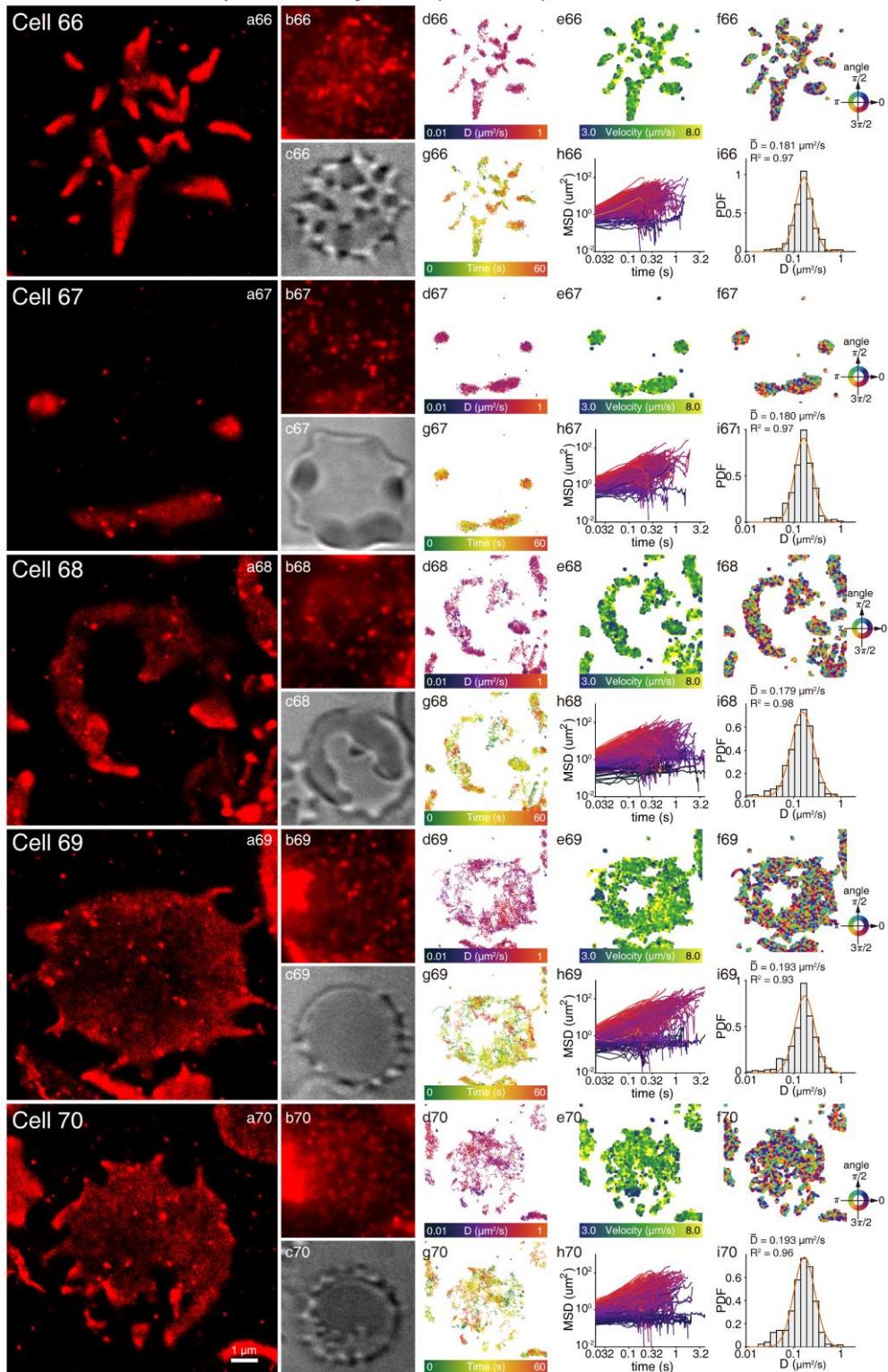
(续图)

Cell 61-65: RBCs poisoned by Pb^{2+} ($t = 0-1$ h)



(续图)

Cell 66-70: RBCs poisoned by Pb^{2+} ($t = 1-2 \text{ h}$)



高通量活红细胞膜的超微结构和流动性分子诊断结果。活红细胞通过 BDP-Mem 染色，并且被捕获后限制在微流控芯片腔室内观察。通过操控芯片的流体环境，发展了 13 种不同状态的红细胞，并对这些红细胞膜进行了分子诊断研究。对于每种细胞的每行实验结果：从左往右，细胞膜超分辨成像重构 (a1-70)，传统全内反射荧成像图 (b1-70)，宽场图 (c1-70)，单分子轨迹重叠图 (d1-70)，速度场图 (e1-70)，扩散方向图 (f1-70)，时间标记轨迹图 (g1-70)，MSD 图 (h1-70) 和平均扩散系数统计 (i1-70)。