

超分辨率成像荧光探针材料应用进展

刘志贺^{1,2}, 吴长锋^{2*}

- (1. 吉林大学 集成光电子国家重点联合实验室 电子科学与工程学院, 吉林 长春 130012;
2. 南方科技大学 生物医学工程系, 广东 深圳 518055)

摘要: 为了进一步认知复杂环境中的细胞生物学过程, 研究人员发展了各种各样的生物成像技术。在这些技术中, 生物荧光成像因简单的成像条件以及对生物样品的相容性而得到了广泛的发展。然而, 传统的荧光成像技术受到了光学衍射极限的限制, 无法分辨低于 200 nm 的空间结构, 阻碍了对亚细胞结构的生物学过程研究。超分辨荧光显微镜技术突破了传统光学衍射对成像分辨率的限制, 能够获取纳米尺度的细胞动态过程。除了对传统的宽场荧光显微镜框架的改进及升级改造之外, 目前典型的超分辨成像显微镜技术通常依赖于荧光探针材料的光物理性质。常用的荧光探针材料包括荧光蛋白、有机荧光分子和纳米荧光材料等。本文介绍了几种主流的超分辨荧光显微成像技术并总结了已经成功应用到超分辨生物荧光成像中的荧光探针材料的应用进展。

关键词: 超分辨荧光成像; 受激发射损耗显微镜; 光激活定位荧光显微术; 随机光学重构显微术; 超分辨光学涨落成像; 荧光探针

中图分类号: R318.51 文献标识码: A doi: 10.3788/CO.20181103.0344

Advances in application of materials of super-resolution imaging fluorescent probe

LIU Zhi-he^{1,2}, WU Chang-feng^{2*}

- (1. State Key Laboratory on Integrated Optoelectronics, College of Electronic Science and Engineering, Jilin University, Changchun 130012, China;
2. Department of Biomedical Engineering, Southern University of Science and Technology, Shenzhen 518055, China)

* Corresponding author, E-mail: wucf@sustc.edu.cn

Abstract: In order to further understand the biological cellular processes in the complex environments, a variety of bioimaging techniques have been developed by researchers. Biofluorescence imaging has been extensively developed due to its simple imaging conditions and compatibility with biological samples. However, the traditional fluorescence imaging technology is restricted by the optical diffraction limit, so it is impossible to resolve the spatial structure below 200 nm, which hinders the study of the biological processes of subcellular

收稿日期: 2018-01-23; 修订日期: 2018-03-13

基金项目: 国家自然科学基金 (NO. 61335001, No. 81771930); 深圳市科技创新委员会基金 (No. JCYJ20170307110157501)

Supported by the Grants from the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 61335001, Grant No. 81771930); Shenzhen Science and Technology Innovation Commission (Grant No. JCYJ20170307110157501)

structures. Super-resolution fluorescence microscopy breaks through the limitations of imaging resolution with traditional optical diffraction and can acquire nanoscale cellular dynamics. In addition to improvements and upgrades to traditional wide-field fluorescence microscope frames, typical super-resolution imaging microscopy techniques currently also rely on the photophysical properties of fluorescent probe materials. Commonly used fluorescent probe materials mainly include fluorescent proteins, organic fluorescent molecules and fluorescent nanomaterials. This paper introduces several mainstream super-resolution fluorescence microscopy techniques and summarizes the application status of fluorescent probe materials that have been successfully applied to super-resolution biofluorescence imaging.

Key words: super-resolution fluorescence imaging; stimulated emission depletion microscopy; photoactivated localization fluoroscopy; stochastic optical reconstruction microscopy; super-resolution optical fluctuation imaging; fluorescent probes

1 引言

纳米技术与生物医学的快速发展和交叉融合促使许多传统学科产生了革命性的变化,形成了纳米生物学这一交叉热点领域。将新兴的纳米技术应用于细胞生物学、肿瘤生物学及临床医学是目前纳米生物医学的研究重点^[1-2]。当前,对于生命系统的认识已经深入到单细胞、单分子水平,迫切需要在分子水平上对细胞的微观结构及生物大分子的动态行为进行实时观测和分析^[3-5]。一方面,人们希望能精密测量活细胞内生物分子的三维空间分布;另一方面,研究者也希望准确理解细胞内发生的各种动态过程:如蛋白质-蛋白质之间如何发生相互作用及其时空结构;结构蛋白与核酸等如何组成细胞的基本结构体系;重要的活性因子如何调节细胞的增殖、分化、凋亡与信号传导等生命活动。反映这些体系结构功能的特征尺度都在纳米量级,如何在纳米尺度上实时观测活体细胞的精细结构及动态行为,对于生物医学及生物信息科学等诸多研究领域都有重大意义。

典型的生物成像技术中,正电子发射断层扫描(Positron Emission Tomography, PET)、光学相干成像(Optical Coherence Tomography, OCT)以及磁共振成像(Magnetic Resonance Imaging, MRI)等技术应用到人类以及动物模型成像中主要受限于空间分辨率($\sim 1\text{ mm}$ 到 $10\text{ }\mu\text{m}$)。电子显微镜(Electron Microscopy, EM)恰好相反,能够提供分子量级的空间分辨率,该技术与生物样品的不兼容

性以及真空成像环境等因素,只能对感兴趣的区域提供单一的成像而不能提供动态的活细胞成像过程。荧光显微镜(Fluorescence Microscopy, FM)利用荧光探针对生物分子进行特异性标记,通过监测荧光信号实现可视化成像,在过去的几十年中,已经成为活细胞、组织中生物分子特异性定位、相互作用以及亚细胞活动过程等研究的重要工具。荧光显微镜最大的优势在于其对活细胞的兼容性,能够进行动态无损的生物成像实验。随着新型荧光探针和成像理论的发展,研究人员开发出了突破光学衍射极限的三维超分辨率荧光成像技术。超分辨成像技术可以以纳米尺度空间分辨在活细胞内观察到亚细胞结构和动态行为,极大地推动生命科学的进一步发展。

Eric Betzig 教授, William Esco Moerner 教授和 Stefan Walter Hell 教授因在超分辨率成像技术中突破性和原创性的贡献而获得了 2014 年诺贝尔奖。和近场光学相比,由于物镜与样品之间的距离比光波长大多,超分辨率成像属于远场光学显微技术。突破光学衍射极限的关键在于调节荧光探针分子在两种状态之间转变(荧光态和非荧光态)。本文对不同超分辨荧光成像技术原理进行介绍并总结近期广泛应用在生物学研究中的超分辨荧光探针材料的发展。

2 超分辨荧光显微镜概述

在分辨率上,荧光显微镜提供了独特的空间和时间分辨率选择(如图 1 所示)。然而,传统光

学显微镜的分辨率受限于光学衍射极限,其分辨率通常是所用光波长的一半。这表明,即使在配备高数值孔径(N. A.)物镜的高精度宽场显微镜上,应用可见光最高只能达到 200 nm 的分辨率(阿贝定律)^[6]。因此,受空间分辨率的限制,生物学中几十到几百纳米的空间范围的诸多亚细胞基础过程都无法通过传统的光学显微镜可视化研究。与传统的光学显微镜相比,超分辨率技术能够提供近 10 倍高的分辨率^[7]。

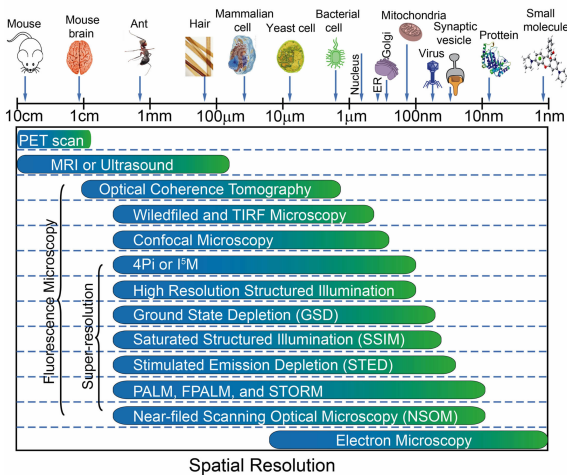


图 1 不同生物成像技术空间分辨率对比图

Fig. 1 Spatial resolution comparison of different biological imaging techniques

根据成像技术的原理,超分辨成像可分为四大类:

(1) 基于光学非线性效应调控、压窄点扩散函数(Point Spread Function, PSF)的超分辨显微成像技术(PSF Modulation)。包括受激发射损耗显微成像技术(STimulated Emission Depletion, STED)^[8-10]、基态损耗(ground state depletion, GSD)、可逆饱和光学荧光跃迁超分辨显微成像技术(REversible Saturable Optical Fluorescence Transitions, RESOLFT),等^[11-13]。

(2) 基于单分子定位(Single-Molecule Localization Microscopy, SMLM)的超分辨显微成像技术。包括光激活定位显微成像技术(PhotoActivated Localization Microscopy PALM)^[14-16]、(直接)随机光学重构显微成像技术((direct) STochastic Optical Reconstruction Microscopy (d) STORM),等^[14, 17-18]。

(3) 基于荧光分子随机涨落(Fluctuation/Blinking)的超分辨显微成像技术。该类技术包括随机光学涨落超分辨显微成像(Super-resolution Optical Fluctuation Imaging SOFI)、贝叶斯超分辨显微成像(Bayesian Analysis of Blinking and Bleaching 3B)^[19-21],等。

(4) 基于频域处理的超分辨成像技术。该类技术主要包括:结构光照明显微成像技术(Structured Illumination Microscopy SIM)和饱和结构光照明显微成像技术(Saturated Structured Illumination Microscopy SSIM)^[22-23]。

这些突破性的思路将光学显微镜的分辨率提升到纳米尺度。随着超分辨率成像技术的出现,用于超分辨率成像的荧光探针材料在化学与生物化学研究中显得尤为重要。对于 STED 显微镜,材料在较强的 STED 激光束照射下要具有足够好的光稳定性且具备受激发射的能力;PALM 和 STORM/dSTORM 要求荧光探针材料具备光激活或光闪烁特性,用来拍摄荧光照片序列并进行单粒子定位和图像解卷积过程;对于 SOFI 来说,材料在激光激发下,需要具有快速的荧光强度涨落特性,通过计算图像时间序列上荧光分子的累积量来实现超分辨成像。到目前为止,用于优化超分辨成像性能的智能荧光材料(荧光蛋白,以及荧光小分子染料和纳米材料等)已经揭示了诸多传统荧光显微镜不能分辨的亚细胞结构及生物过程。本文对不同超分辨技术原理进行介绍并总结近期广泛应用在生物学研究中的超分辨荧光探针材料的发展。结构光照明超分辨成像(SIM)对荧光探针无特殊要求,荧光探针的可选范围较广,但本文不对 SIM 成像的荧光探针进行总结。

3 受激发射损耗荧光显微镜(STED)

STED 显微镜技术由 Stefan Walter Hell 教授提出并付诸实践^[8, 24]。传统荧光显微镜中,在激发光照下,激发态的荧光探针分子通过自发辐射而发射荧光形成衍射极限图像。在 STED 显微镜(基于扫描共聚焦显微镜的扫描方式)中,引入第二束激光(STED 光束)将原本自发辐射(寿命

约为几纳秒)的荧光分子通过受激发射过程将其激发态快速损耗到基态。环形的 STED 激光束使处于两束激光交叠区域的荧光分子被损耗掉,处在焦平面 STED 环形光中心区域的荧光点便是被压缩了的点扩散函数 (PSF), 以此提高分辨率^[25]。由于 STED 激光对荧光分子具有再激发效应,因此 STED 光波长应该远离吸收波段,但要在荧光发射的附近位置(如图 2 所示)。STED 是一种确定性的功能技术,利用荧光团的非线性响应,在衍射极限以下达到更高的分辨率。

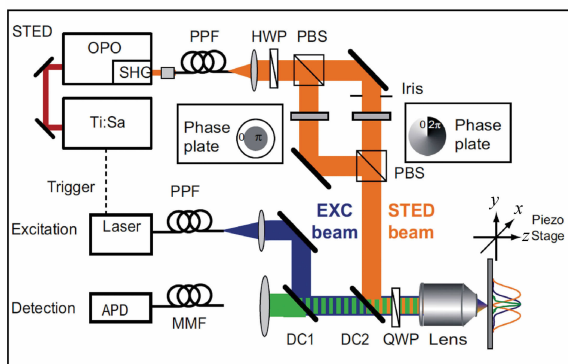


图 2 STED 超分辨显微镜原理示意图^[25]

Fig. 2 Basic light-pathway diagram and the principle of STED microscopy^[25]

由于环状 STED 光的面积理论上可以通过不断增加其光强进行无限增大,因此,激发区域的光斑可以无限小于衍射极限,最后通过扫描的方式进行成像。STED 的分辨率公式为:

$$d = \frac{\lambda}{2n \sin \theta \sqrt{1 + I/I_s}}, \quad (1)$$

式中, I_s 是荧光染料的饱和受激辐射强度,定义为探针材料荧光发射强度被损耗到一半时的 STED 光强度; I 表示 STED 光强度。由公式(1)可知,随着 STED 光强的增加,理论上可以无限增加分辨率。在实际实验过程中,荧光分子的饱和光强范围为 $10 \sim 100 \text{ MW/cm}^2$, 为了获得较高的空间分辨率,实验中需要足够强的 STED 光功率密度,对样品的光损伤和光漂白影响较为严重^[26-28]。为了降低对样品的光损伤和光漂白的影响,与 STED 类似的成像技术得到进一步的发展,其中包括基态损耗 (Ground State Depletion, GSD) 等不同方式的超分辨率荧光显微成像技术^[29-30]。

3.1 用于 STED 显微镜的荧光材料

在光学显微成像实验中,通常选取红光发射的荧光探针,由于其需要较低的激发光子能量以及极低的背景干扰。特别是罗丹明类的衍生物 ATTO647N, 由于具有较高的量子效率和较大的消光系数,在 STED 显微镜中使用最为广泛。此外,另一种红光发射的染料 KK114, 具有较好的光稳定性和较好的水溶性,在 STED 显微镜中的应用同样比较广泛。由于 KK114 是带负电荷的染料,不能透过细胞且 NHS 酯的稳定性较低等缺陷抑制了其应用。为了避免这些缺点, Wurum 等人设计合成一系列具有高量子效率且改进了 NHS 酯稳定的新型红光罗丹明染料(如图 3 所示)。该系列探针能以较高的对比度实现低于 25 nm 的 STED 空间分辨率的细胞成像^[31]。

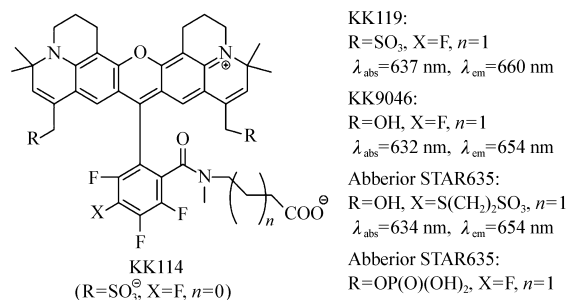


图 3 红光发射的罗丹明荧光分子结构式

Fig. 3 Chemical structures of red-emitting rhodamine fluorophores

为了能够达到较高的成像分辨率,STED 显微技术需要一个高功率的 STED 激光作为第二光源去擦除非靶标处的荧光。因此,具有大斯托克斯位移的荧光分子受到了青睐,因为此类荧光分子受激发射光的波长可以和自发辐射的荧光波长明显区分,有利于对中心亚衍射极限的荧光斑点信号的收集。Hell 等人设计合成了一系列基于香豆素分子结构的衍生物荧光探针,这些探针具有较好的光稳定性、较高的荧光亮度和大的斯托克斯位移(如图 4 所示)^[32]。分子 1 是通过 1-(3-羧基丙基)-4-羟甲基-2,2-二甲基-1,2-二氢喹啉片段与香豆素荧光分子和 3-[2-(2-吡啶基)乙烯基]残基耦连得到的。其吸收和发射峰位分别在 472 nm 和 623 nm 。分子中的磷酸基团用来增强

了染料分子的亲水性和荧光量子产率,同时减少了非特异性结合。此外,活性羧酸基团用来生物耦连以实现免疫荧光标记实验。分子 1d (Star470SX+) 是红光发射的香豆素类荧光染料,通过二抗标记实现对高尔基体网络中 cis-Golgi 和 trans-Golgi 精细可区分的多色 STED 超分辨成像,其光学分辨率约为 70 nm。

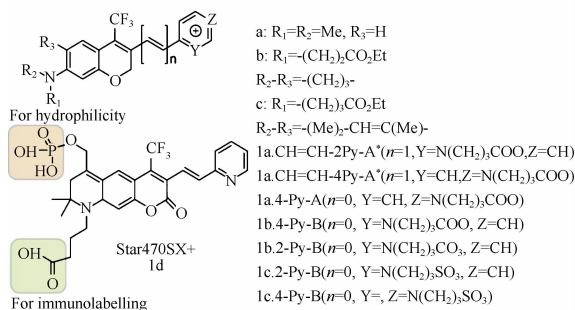


图 4 用于 STED 荧光显微镜的荧光分子 1 及其衍生物结构式

Fig. 4 Chemical structures of fluorescent molecular 1 and derivatives used in STED microscopy

为了更加精细的识别细胞器结构功能和动力学过程,荧光探针除了应该具有足够的光稳定性、高荧光亮度以及能与活细胞相容等性质外,细胞渗透性和较低的光毒性同样至关重要。Schepartz 等人^[33]发展了一种基于脂质的策略以克服高尔基体的结构成像和动力学过程的挑战。该方法是在活细胞超分辨成像中引入生物正交反应。通过两步过程进行实验标记:用含有高尔基靶向官能基团的反式环辛烯(Cer-TPO)的神经酰胺脂质处理细胞,高荧光亮度、含有四嗪标记的官能团的近红外发光染料 SiR-Tz (分子 2) 用来特异性识别 Cer-TCO, 硅-罗丹明分子(SiR)用来显示荧光信号(如图 5 所示);当两种分子在高尔基体内接近时,四嗪和反式环辛烯通过无铜点击反应快速连接在一起,反应生成具有较好光稳定性的染料 Cer-SiR(分子 3),从而有助于 3D 荧光成像和 STED 超分辨高尔基体的成像分析。

由于硅-罗丹明(SiR)衍生物(如图 6 所示,分子 4)具有高荧光强度,低光毒性以及环境依赖的 OFF 态(非荧光螺旋体)/ON 态(荧光两性离子)转化的行为,能够明显的区分它们与极性蛋白质

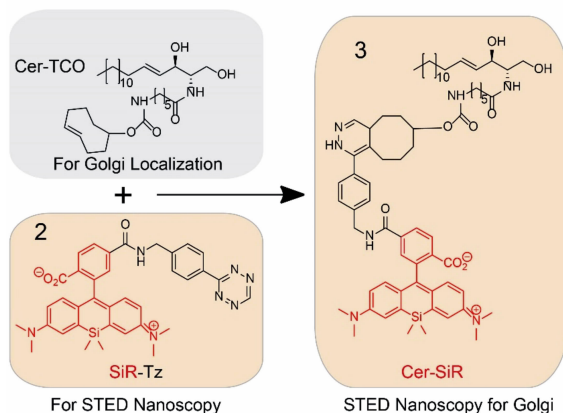


图 5 荧光分子 2 和 3 的化学结构式及在活细胞中的正交反应示意图

Fig. 5 Chemical structures of fluorescent molecular 2 and 3 and the bioorthogonal reaction in live cells

表面非特异性结合(ON 态)到疏水表面(OFF 态)的变化过程。分子 4 在聚集态是无荧光的 OFF 态。Johnsson 等人^[34]根据这种性质开发了两套由 SiR 衍生物与多西他赛(分子 5)和脱溴去甲基茉莉酮酸(分子 6)组成的荧光探针(如图 6 所示),对活细胞中的细胞骨架结构进行超分辨率成像。Hell 等用荧光分子 6 作为探针,首先报道了活细胞中海马神经元轴突中树突状皮质下肌动蛋白的存在,该结果与早期电子显微镜实验结果一致^[35]。损耗光波长处在近红外区域的荧光探针光稳定性好,ON/OFF 的转换效率高,降低了光散射并且对生物组织无毒。Hell 等人设计了一系列基于分子 7 的探针(如图 6 所示),该类探针光稳定性好,水溶液中量子效率高,吸收和发射峰位分别处在 600 nm 和 680 nm。与常用的罗丹明染料($\lambda = 750 \sim 770$ nm)不同,这些小分子量的荧光探针(分子量小于 600)在 STED 显微镜中,使用长波长($\lambda = 800$ nm)的损耗激光使成像性能获得关键的提升^[36]。

在典型的扫描 STED 显微镜,荧光分子的吸收截面常为 $10^{-16} \cdot \text{cm}^{-2}$,激发态寿命为几纳秒,STED 光强度常用 $3 \sim 10 \text{ MW} \cdot \text{cm}^{-2}$ 。在扫描的过程中,荧光被 STED 光损耗掉的荧光分子在需要发光时能够快速恢复。只有当其保持在 S_0 或 S_1 状态时,才能确保及时的恢复荧光发射。通常,不希望过渡到更高的激发态 S_n ($nv > 1$) 或三线

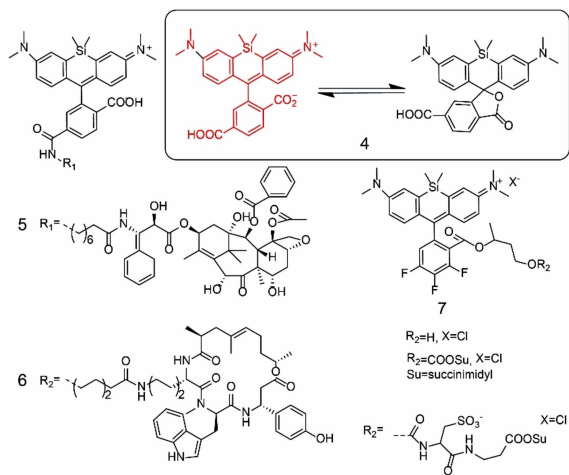


图 6 荧光分子 4~7 的化学结构式

Fig. 6 Chemical structures of fluorescent molecules 4~7

态,荧光分子不能经历长时间的暗态或光漂白,因此牺牲了光稳定性。通过特殊的氧化还原系统(ROXS,还原剂抗坏血酸或 Trolox;氧化剂甲基维生素或 Trolox-醌)可以显著提高荧光分子的光稳定性。在氧化还原反应缓冲溶液中形成了自由基阴离子和阳离子,激发的三线态的荧光分子被快速退激发掉。随后的自由基物质会进一步通过整体氧化还原反应回落到单线态基态。Sauer 等人通过这种方法提高了 ATTO647N 的光稳定性并且使空间分辨率提高了几倍($< 30 \text{ nm}$)。用甲基紫精-羧酸作为氧化还原缓冲液,在 63 mW 的 750 nm STED 光擦除下,单个 ATTO647N 分子图像的精度达到了 1.8 nm ^[37]。Johnsson 等人通过调节 SiR 官能团,在 SiR650 的基础上发展了一系列的用于亚细胞结构(微管结构、溶酶体、肌动蛋白)靶向的 SiR700 的荧光探针,并实现了 100 nm 的结构光成像和约 50 nm 的 STED 细胞微管成像^[38]。

目前,小分子荧光分子由于其优异的特征,仍然是 STED 显微镜的主要荧光探针。为了拓展 STED 显微镜的应用范围, Hell 等使用商用的 CdSe/Zns 和 CdTe/ZnS 核壳结构的红光发射量子点(Qdots)作为 STED 的荧光探针,其 STED 激光波长为 775 nm ,实现了对 Qdots 标记的成纤维细胞波形蛋白片段的 50 nm 的空间分辨率的成像^[39]。Qdots 较好的光稳定性能够保证可以重复

扫描 1000 帧以上的图像而不降低图像对比度;因此 Qdots 可作为较长时间成像的荧光探针。

4 光激活定位显微镜(PALM)和随机光学重构显微镜(STORM)

克服衍射极限造成的分辨率限制的另一种方法是基于荧光团在 ON 状态(荧光)和 OFF 状态(非荧光)之间随机切换特性的超分辨荧光显微镜。该方法主要是通过特定时间的光诱导下探测随机激活荧光团(有机荧光染料和荧光蛋白)的一系列荧光信号。荧光分子在组合激光(激活和激发光束)的照射下能够光转换。荧光分子的随机光开关性质在每帧图像产生稀疏的荧光信号,通过二维的高斯函数拟合的分析算法对荧光团精确定位。最后,通过对所有的单个激活的荧光团的位置叠加重建出超分辨荧光图像。该方法的核心在于利用二维高斯函数来拟合出单个荧光分子在宽场荧光显微镜下的位置。定位中心的误差,即定位精度,可由公式(2)给出:

$$\sigma = \sqrt{\frac{s_i^2}{N} + \frac{a^2/12}{N} + \frac{8\pi s_i^4 b^2}{a^2 N^2}}, \quad (2)$$

式中, s 为点扩散函数的标准方差, a 为探测器 CCD 像素的大小(单位: nm), N 为收集到的光子数, b 为背景噪声。单分子定位的理论分辨率为^[40]:

$$d = \frac{1}{\sqrt{N}} \cdot \frac{\lambda}{2n\sin\theta}. \quad (3)$$

根据公式(2)和(3)可知,如果荧光探针发射的光子数越多,荧光成像过程中引入的背景噪声就越小,定位精度越高。对于生物荧光探针来说,单个荧光蛋白分子能够被有效检测到的光子数约为几百个,而单个荧光染料分子为几千个。因此,定位精度可以达到几纳米的范围。通过重建数千帧荧光图像获得单个高空间分辨率图像,用时间分辨率来换取空间分辨率。因此,要想获得超分辨率图像,荧光探针材料的性能至关重要。PALM 和 STORM 技术的工作原理比较类似^[14,17],但是分别使用不同的荧光探针(如图 7 所示)。PALM 技术使用的荧光探针是在完全光漂白之前能够完成一次或几次光转换或光激活循环的过程的荧光

蛋白 (FPs) 或有机荧光分子, STORM 技术使用的则是可逆光转换的有机荧光分子作为荧光探针^[41-43]。PALM 和 STORM 技术都是通过宽场显微镜上配备的灵敏的面阵探测器探测荧光分子的发光并结合单分子定位的图像重构技术。

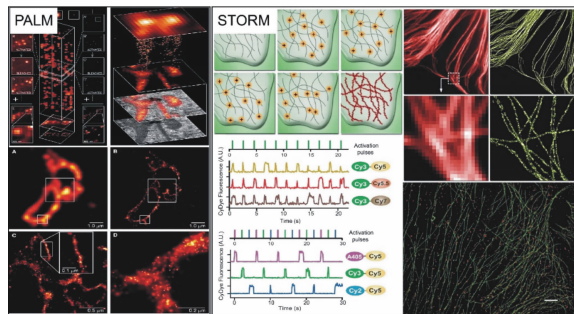


图 7 光激活定位显微镜和随机光学重构显微镜工作原理及亚细胞结构超分辨图(左侧: PALM 及 COS-7 细胞溶酶体超分辨图像; 右侧: STORM 原理图及亚细胞结构单色、多色超分辨图像)^[14,17]

Fig. 7 Working principle of Photoactivation Localization Microscopy, Stochastic Optical Reconstruction Microscopy and subcellular structure super resolution images (Left: PALM and COS-7 cell lysosomal super-resolution images; right: STORM schematic and subcellular structure monochrome, multicolor super-resolution images)^[14,17]

4.1 用于 PALM 的荧光材料

在活细胞超分辨率成像中, 荧光蛋白 (FPs) 因具有基因编码的靶向能力且容易开发, 仍然是不可或缺的生物荧光探针的选择^[41,44]。与此同时, 过去的几十年中, 有机荧光分子由于具有独特的光谱可调性、溶解度和靶向特异性等优点在超分辨率显微成像技术中得到了广泛的应用。如前所述, 在超分辨率成像中有机荧光探针的发射是通过可逆的光转换来实现的。Moerner 等人设计了一种有机荧光分子 (如图 8 所示, 分子 8), HaloTag 与叠氮基-二氰基亚甲基二咪唑 (DCDHF) 结合, 用在固定的细胞以及活细胞成像中精确标记细胞蛋白^[45]。Moerner 等人使用分子 8 成功实现了细胞骨架蛋白 (Popz、FtsZ 和 AmiC) 的 PALM 超分辨率成像。随机和可逆的光激活在分

子内部是一个推挽过程, 含氨基的 DCDHF (如图 8, 分子 9) 具有高亮度, 适用于超分辨率成像。将氨基替换成硝基可以提高 DCDHF 在超分辨成像中的响应。在硝基还原酶 (NTR) 和电子给体 (NADH) 的存在下分子 10 中所含的硝基被还原, 因此该分子在实验期间不需特殊处理并且不存在光依赖的激活 (如图 8) 等优点。该分子在活细菌细胞内硝基还原酶的超分辨率成像中数据采集时间低于 10 min^[46]。

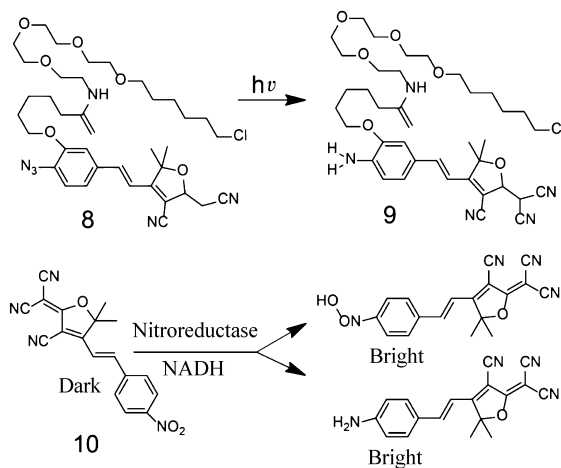


图 8 荧光分子 8 ~ 10 的化学结构式

Fig. 8 Chemical structures of fluorescent molecules 8 ~ 10

2007 年, S. W. Hell 等人报道了罗丹明荧光分子 (如图 9 所示, 分子 11, SAR577) 可用于基于单分子光转换的荧光纳米显微镜。在紫外光 (单光子情况下) 或者是双光子激光照射下, SAR577 在安非他酮内酯 (无荧光) 和两性离子形式 (荧光) 之间进行光开关转换。该类分子处于荧光态时可发射足够多的光子, 在活细胞中获得较高的空间分辨率图像。荧光态和暗态光强度的高对比度使之在高密度标记的样品中获得精细的结构图像。利用这种方法, 轴向可获得 0.5 ~ 1 μm 的光学切片, 提高了基于单分子显微镜技术多层成像的适用性。应用 PALM 荧光显微镜, 利用包覆了不同荧光分子 (SPA545, SRA577, SRA617) 的二氧化硅纳米球实现了 15 nm 空间分辨率和多色超分辨成像^[47]。另外, SRA577-NHSS 和含有马来酰亚胺的 SRA552 罗丹明类似物能够实现哺乳动物细胞中微管和角蛋白网络的多色单分子定位超分

辨成像。在细胞生物成像实验中,长时间的紫外光照射对生物样品有较大的损害。Moerner 等人调控了传统的使用紫外光照明的光转换罗丹明荧光分子,得到了一系列的可见光激发的罗丹明衍生物(如图9所示,分子12~21)。此外,他们在荧光团的内酰胺氮上引入了各种共轭发色团,在不对其光物理性质产生影响的情况下降低光活化所需的能量。新的荧光分子进一步功能化后,特异性标记分布在革兰氏阴性新月牙菌的活细胞表面上的胺。应用 PALM 显微镜在低能量激光(405 nm)下成功的标识出了 10~20 nm 的二维和三维的细胞表面^[48]。

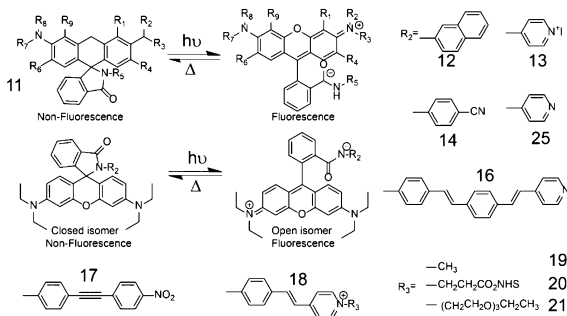


图9 罗丹明衍生物(11~21)光诱导转换过程分子结构式

Fig. 9 Photoinduced reversible switching process of rhodamine derivatives(11~21)

基于罗丹明分子结构,Lavis 等人发展了一种将季碳原子替换黄嘌呤氧的方式合成荧光素的红移同构体和罗丹明 110,命名为 Carbofluorescein(如图10所示,分子22)和 Carborhodamine110(如图10所示,分子23),优异的光谱性质和光稳定性使得它们可以用于高对比度成像应用。此外,为了比较 PALM 显微镜对活细胞成像的质量,通过连接一个对光不稳定的结构,合成了含有鬼笔环肽的 Carborhodamine110 类似物(如图10所示,分子24),实现了老鼠成纤维细胞肌动蛋白的成像。与商用的鬼笔环肽 AlexaFluor647(AF647)相比,分子24光子产量高,成像对比度高,并且能够提供比 AF647 高两倍的定位精度^[49]。

半花青染料,由于具有光致变色的光诱导荧光转换行为,在超分辨率成像显微镜领域受到广泛的应用。Raymo 等人研究了半花青荧光分子的

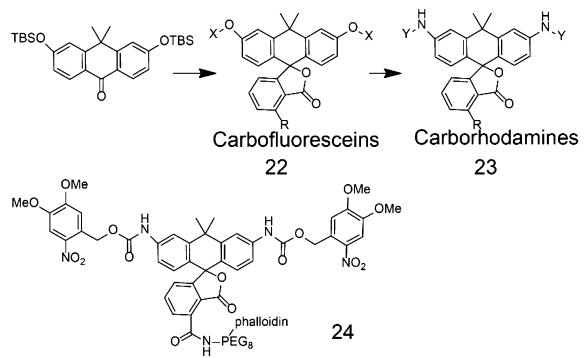


图10 Carbofluoresceins, Carborhodamines110 的分子结构式

Fig. 10 Chemical structures of carbofluoresceins, carborhodamines110(28)

化学结构和光转换性能之间的关系。设计了一系列的基于半花青的荧光分子(如图11所示,分子25~29)。该类分子是基于2,3,3-三甲基-3H-二氢吲哚与另一种发色团(如联苯,花青或苝)结合的季铵盐。将2-羟基-5-硝基苄基连接到染料的N-位上,在紫外线和可见光照射下能够使之在暗态与荧光态之间转变。将单分子染料装载到有机聚合物中制备形成纳米粒子并用到超分辨率成像中,该类荧光探针具有较好的单粒子荧光闪烁特性,空间分辨率能够达到 28 nm^[50]。Hu 等人利用光致变色荧光分子通过超分辨显微镜验证了聚合物纳米粒子中的核壳结构和定位模式^[51]。首先,将分子30共轭偶联到双亲性聚合物材料上,然后将聚合物包覆在碳酸钙壳层中,得到核壳纳米结构材料(如图11所示)。通常,荧光分子处于非荧光的螺吡喃形式。在 365 nm 光照射下转换为荧光态,在 561 nm 的可见光照射下转换到螺吡喃形式;由于提高了聚合物负载分子的密度,实验数据采集时间由之前的几小时缩短到几分钟,实现了更快速的 PALM 显微成像。Zhang 等人使用花青染料设计了基于超分辨率成像的传感器探针(如图11所示,分子31),用来定量活细胞中的微管蛋白。在结合微管蛋白之前,分子31处于暗态(如图11所示,分子32)。选择性结合,后在 375 nm 照射时荧光发射增强,分子31可以在 20 nm 的空间分辨率下检测微管蛋白位点的选择性^[52]。

为了进一步丰富适用于 PALM 显微镜的新荧

光材料,Zhu 等人开发了一种 pH-敏感、具有光开关性质的水溶聚合物纳米系统(如图 11 所示,分子 34)对酸性的溶酶体超分辨率成像。分子 34 中的聚-N-异丙基丙烯酰胺(NIPAM)作为载体材料来调节亲水性,萘二甲酰亚胺(NI)作为 pH 敏感单元,光敏性的二甲基亚乙烯(DTE)用来调节荧光闪烁特性。该聚合物材料被活细胞内吞后首先定位到溶酶体。酸性溶酶体将聚合物的暗态转换为荧光态(分子 33)。交替的光照射调节聚合物的光闪烁,实现了 40 nm 空间分辨率的超分辨率成像^[53]。

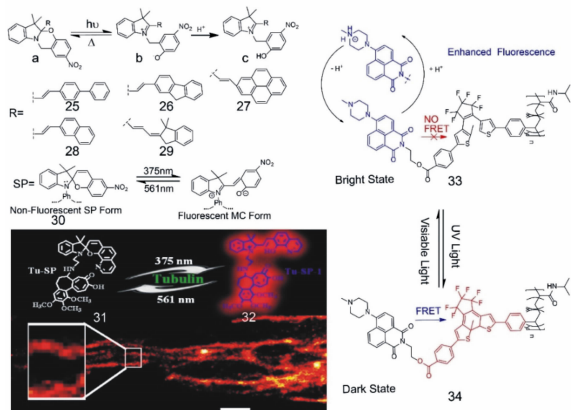


图 11 分子 25 ~ 32 开关过程的化学结构式以及通过荧光分子 31 实现的细胞超分辨率图像;紫外光照射下分子 34 的光开关转换过程^[52-53]

Fig. 11 Chemical structures and the switching process of 25 ~ 32 and superresolution images obtained with 31 in live cells. Photoswitchable process of 34 under irradiation with UV/visible light^[52-53]

4.2 用于 STORM/dSTORM 的荧光材料

Zhuang 等人在 2008 年报道了一系列可开关的荧光探针,来实现多色随机光学重构显微镜(STORM)。荧光探针由活化剂(例如:Alexa405, Cy2, Cy3)、能量供体和能量受体(如 Cy5)组成,可在 ON/OFF 之间循环开关并应用到多色 STORM 超分辨率成像^[54]。进一步地,应用到 DNA 多色超分辨率成像,能够在纳米尺度直接观察分子间相互作用。此外,她们将这种方法扩展到细胞内,实现了微管和网格蛋白有被小窝的超分辨率 STORM 成像。在探测光路中配置一个半圆柱

透镜,通过其散光来确定每个独立荧光分子的轴向和横向的位置,然后重复光开关过程。这种方式能够获得 20 ~ 30 nm 的侧向和 50 ~ 60 nm 的轴向分辨率的三维成像(如图 12 所示)^[55]。

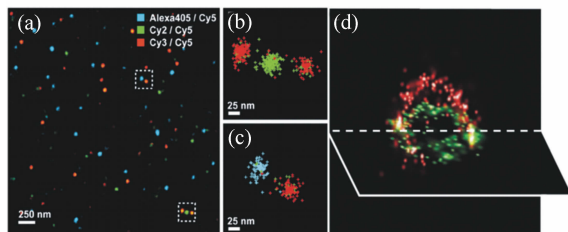


图 12 (a ~ c) 3 种不同 DNA 结构的三色 STORM 图像 (Alexa405/Cy5, Cy2/Cy5 和 Cy3/Cy5 标记;405 nm, 457 nm 和 532 nm 激光激发); (d) Alexa647/Cy3 标记的 BC-S-1 细胞内网格蛋白凹坑 (CCPs) 的三维 STORM 图像^[54-55]

Fig. 12 (a ~ c) Three-color STORM images of three different DNA constructs (labelled with Alexa405/Cy5, Cy2/Cy5, and Cy3/Cy5, activated using 405, 457 and 532 nm laser, respectively); (d) 3D STORM image of clathrin-coated pits (CCPs) stained with the Alexa647/Cy3 in BS-C-1 cells^[54-55]

与之前 STORM 技术使用荧光蛋白或荧光分子对(激活剂和荧光报告分子)作为探针不同,Sauer 等用常规荧光分子作为荧光探针,使用不同波长的光激发实现光转换来进行超分辨率成像,并将这种技术命名为直接随机光学重构显微镜(dSTORM)。使用市售的荧光探针(如图 13 所示,分子 35),可以在几分钟的时间内获得细胞内蛋白质的 20 nm dSTORM 成像^[56]。

花青染料在荧光态具有较高的光子发射产率而被看作是理想的 STORM 荧光探针。适当的 pH 下,在初级硫醇(b-甲基乙醇)和三(2-羧乙基)膦(TCEP)存在下,花青染料转化为暗态。通过电子离子化液相色谱-质谱(ESI-MS)检测到硫醇共轭 π -电子的破坏,分子中巯基和 TCEP 加入后,形成了新产物(如图 13 所示,分子 37 和 38)。将非荧光加合物通过紫外光照射可逆的转化为分子 36 的发光形式^[57-58]。Squier 等通过 FRET 对(如图 13 所示,分子 39)检测细菌细胞中的四半胱氨酸

蛋白。该探针由含双砷的 Cy3-Cy5 能量转移对组成, Cy3 作为能量供体(激活剂),接收 Cy5 的荧光做超分辨成像。与靶蛋白(如, RpoA*)共价连接后,由于 Cy3 聚甲炔链的刚性运动,有明显的荧光增强(Cy5, 20 倍的增加)。STORM 能够以 20 nm 的空间分辨率识别单个分子^[59]。Haynes 等使用市售的 Alexa Fluoro 488 激活的羧酸酯对革兰氏阴性细菌表面外膜蛋白标记,得到了 30 ~ 40 nm 的 STORM 定位精度^[60]。Gianneschi 等人开发了对金属蛋白酶(MMP)有响应、Alexa647 标记的肽-聚合物两亲物(PPA)纳米粒子(如图 13 所示,分子 40),来研究 HT-1080 人纤维癌中胶束的累积和增强的滞留行为^[61]。

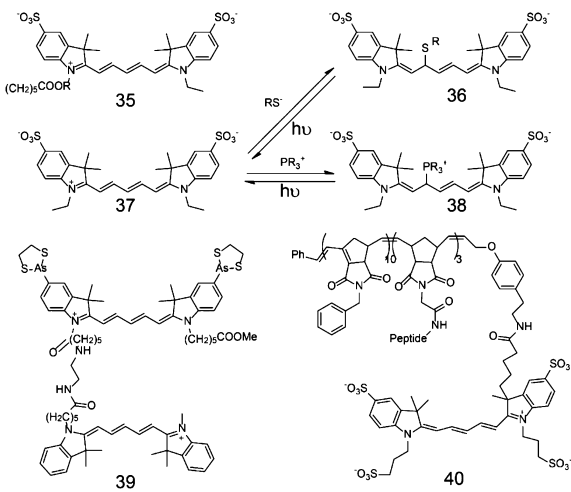


图 13 花青染料(35 ~ 40)分子式和假设的闪烁机制
Fig. 13 Chemical structures of cyanine dyes (35 ~ 40) and the proposed photobleaching mechanism

Sauer 等人报道了一种基于市售的罗丹明和恶嗪(Alexa 和 ATTO)(如图 14 所示,分子 41 ~ 48)的荧光分子,在生理环境下实现了简便的超分辨率成像方案。使用各种硫醇(b-巯基乙胺(MEA)、二硫苏糖醇(DTT)或谷胱甘肽(GSH))作为还原剂,通过增加暗态的寿命来选择性的抑制激发三线态。实验过程中,氧气和氧化剂的存在确保荧光探针转换到荧光态。此外,使用市售的有机荧光分子通过该方案实现了对活细胞 RNA 的超分辨成像^[62]。为有机小分子荧光探针分子应用到多色超分辨成像开辟了新的途径。

如前所述,理想的活细胞成像荧光探针应该

具有高光子通量的光转换或光激活性质,在近红外吸收和发射,以及较高的膜渗透性,这样最有利于对细胞内蛋白质标记研究。Johnsson 等人提出了一类新的 SiR 荧光探针(如图 14 所示,分子 50 ~ 53),这些荧光分子具备以上提出的所有要求并且容易合成,用于活细胞和组织中蛋白的特异性成像。另外,含有羧基的 SiR 分子在低介电常数的溶剂中处于螺内酯形式的暗态,其光闪烁性质能够用于 STORM 成像。使用如图 14 所示的分子 50(SiR-SNAP)、51(SiR-CLIP)和 52(SiR-Halo)荧光探针实现了对 Hela 细胞的蛋白的高效多色荧光标记^[63]。

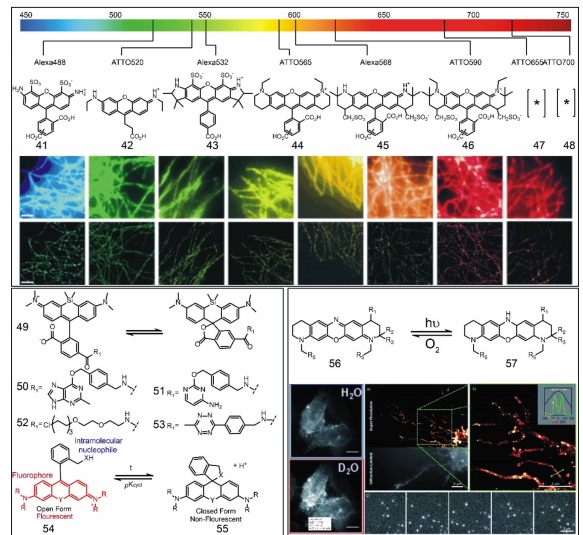


图 14 STORM 荧光探针 41 ~ 48 结构式及细胞微管的超分辨图像^[62]; Si-罗丹明荧光分子(49 ~ 55)衍生物以及分子 54 在合适 pH 环境中闪烁机制的模型及相应的化学结构式^[65]; ATTO655 标记的 CCR5 在水和重水不同环境下,分子 56 和 57 在光照时互相转化过程以及亚细胞结构图像^[66]

Fig. 14 Chemical structures of fluorescent dyes (41 ~ 48) used in STORM^[62]; Chemical structures of 49 - 55 and proposed photobleaching mechanism of 54 in a suitable pH environment^[65]; Photoswitching between 56 and 57 upon photoirradiation in the presence of oxygen and ATTO655-labelled CCR5 imaging of live cells in H_2O and D_2O ^[66]

Urano 等人开发了一类 SiR 荧光分子(如图 14 所示,分子 54),该荧光分子无论在硫醇的存在与否和辐照强度如何,都能够实现自发光闪烁。在生理 pH 环境下,羧甲基-SiR (HMSiR) 处于己内酯形式的暗态(如图 14 所示,分子 54)。在激发光照射下,处于两性离子形式的荧光态(如图 14 所示,分子 55),其中的一些开始自发的闪烁,且荧光发光时间足以用于检测。使用分子 54,实现了核孔结构的单分子定位成像和活细胞内结构的追踪^[64]。

在基于单分子的超分辨显微镜中,通常使用基于酶的除氧系统或通入惰性气体的方式来提高荧光分子的光稳定性以及调节荧光分子的光开关和最佳荧光响应。Doose 等人证明亚甲基蓝(MB)-硫醇可用作高效快速的除氧系统。在光照下 MB 生成活性氧(ROS) MB^+ ,在适当的还原剂存在下, MB^+ 可以进一步被还原成 MBH 达到了消耗分子氧的目的。使用 Cy5 标记的抗体,Doose 通过 dSTORM 显微镜在 HeLa 细胞微管中研究了 MB-硫醇作为超分辨成像的除氧剂的重要作用^[65]。

通常,市售的红光发射的有机荧光探针量子产率低、发光亮度有限。Furstenberg 等人报道了一种增强了商业荧光分子的荧光量子效率的方法。该荧光分子可以在氧化态(如图 14 所示,分子 56)和还原态(分子 57)之间转化。将缓冲溶液中的水替换成重水(D_2O)量子效率提高了两倍。这主要是由于在无辐射跃迁的过程中,氢键辅助失活从而减少荧光淬灭过程。此外,使用这种方法还对 ATTO655 标记的趋化因子受体 5(CCR5)的结构实现了 20 nm 空间分辨率的超分辨成像(dSTORM)^[66]。

5 超分辨光学涨落荧光成像(SOFI)

2009 年,Dertinger 等人发展了一类新型的超分辨率成像技术,被称为超分辨光学涨落成像(SOFI,如图 15 所示),SOFI 是基于相互独立的荧光发色团荧光强度的随机涨落来实现分辨率提高的成像技术^[19]。荧光材料只需在激光照射下产

生荧光强度的涨落而不需要具有 OFF-ON 的状态转换。通常,可以利用氧化还原反应的缓冲溶液(如 dSTORM)或荧光发色团本身的光转换(可光转化的荧光蛋白和量子点等)来实现荧光强度的涨落。首先拍摄一系列的荧光图像序列,然后进行随时间的波动的高阶统计分析,找出每个发色点的独特的强度波动曲线。在检测特征的波动曲线时,可以将单个荧光分子彼此区分开。SOFI 适用于高阶累积量来重建超分辨率图像^[19]。如果能够探测到足够多的光子数,累积量的阶数越高,则能够得高更高分辨率的图像。

假设一个生物结构由 N 个独立发光的荧光分子标记,其荧光分子的荧光强度在时间上随机、独立进行闪烁或波动,那么在空间位置 r 、时刻 t 时的荧光信号强度 I 可以表示为^[19]:

$$I(\mathbf{r}, t) = \sum_{k=1}^N \epsilon_k U(\mathbf{r} - \mathbf{r}_k) s_k(t) + b(\mathbf{r}) + n(\mathbf{r}, t), \quad (4)$$

式中, ϵ_k 表示荧光分子的荧光强度, $U(\mathbf{r} - \mathbf{r}_k)$ 表示位置 \mathbf{r}_k 荧光分子处的光学系统的点扩散函数(PSF)。 $s_k(t)$ 表示第 k 个荧光分子在时刻 t 的归一化的时间随机波动函数, $b(\mathbf{r})$ 表示背景噪声, $n(\mathbf{r}, t)$ 表示图像的噪声。

通常显微镜光学系统的 PSF 表示为式(5):

$$U(\mathbf{r}) = \exp\left(-\frac{x^2}{2\sigma_x^2} - \frac{y^2}{2\sigma_y^2} - \frac{z^2}{2\sigma_z^2}\right). \quad (5)$$

不同荧光分子 \mathbf{r}_k 的荧光强度在时间维度上是随机且独立的,因此,不同荧光分子荧光强度在时间序列上的互相关运算值为 0。SOFI 技术是通过计算探测器上每个像素点的荧光波动的 n 阶累积量函数(Cumulant Functions, CF)。探测器上的荧光闪烁表示为式(6):

$$\delta I(\mathbf{r}, t) = I(\mathbf{r}, t) - \langle I(\mathbf{r}, t) \rangle_t, \quad (6)$$

式中, $\langle I(\mathbf{r}, t) \rangle_t$ 表示 t 时间内荧光信号强度的平均值。 n 阶累积量函数为式(7):

$$G_n(\mathbf{r}, \tau_1, \tau_2, \tau_3, \dots, \tau_n) = \langle \delta I(\mathbf{r}, t) \delta I(\mathbf{r}, t + \tau_1) \dots \delta I(\mathbf{r}, t + \tau_n) \rangle_t. \quad (7)$$

由于系统噪声和背景在时间序列上是随机的没有相关性,因此 n 阶累积量可以消除背景及噪声的影响。对于一个 2 阶相关函数则可以表示为式(8):

$$G_2(\mathbf{r}, \tau) = \langle \delta I(\mathbf{r}, t) \delta I(\mathbf{r}, t + \tau) \rangle = \sum_{k=1}^N \epsilon_k^2 U^2(\mathbf{r} - \mathbf{r}_k) \langle \delta I(\mathbf{r}, t) \delta I(\mathbf{r}, t + \tau) \rangle. \quad (8)$$

从2阶相关函数可以看出, \mathbf{r}_k 处的 PSF 在三维上被压缩了 \sqrt{n} 倍。这样三维的分辨率提升了 \sqrt{n} 倍。此时的 PSF 表示为式(9):

$$U^n(\mathbf{r}) = \exp\left(-n \frac{x^2}{2\sigma_x^2} - n \frac{y^2}{2\sigma_y^2} - n \frac{z^2}{2\sigma_z^2}\right) = \exp\left(-\frac{x^2}{2\left(\frac{\sigma_x^2}{\sqrt{n}}\right)^2} - \frac{y^2}{2\left(\frac{\sigma_y^2}{\sqrt{n}}\right)^2} - \frac{z^2}{2\left(\frac{\sigma_z^2}{\sqrt{n}}\right)^2}\right), \quad (9)$$

通常, SOFI 的处理过程是计算互累积量, 这样能够进一步的消除了使用自相关运算过程中产生的散粒噪声的影响。使用傅里叶加权法(Fourier reweighting)、反卷积 SOFI 的 PSF 等方法, 可以实现 n 阶累积量计算达到三维分辨率 n 倍的提升^[67-71]。

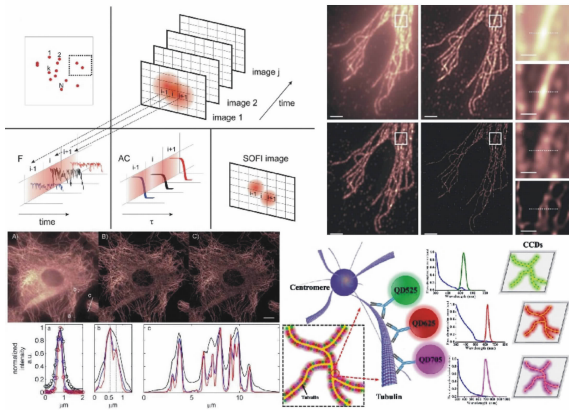


图 15 SOFI 成像原理示意图及使用 Qdots 标记的细胞微管 SOFI 图像^[19, 67, 72]

Fig. 15 Principle of SOFI imaging and SOFI images of cell microtubule labeled with Qdots^[19, 67, 72]

SOFI 显微术能够在三个维度同时提高对比度。该技术具有简单、快速、曝光时间短以及对设备要求低等优点。唯一的要求是用于标记的荧光分子具有能够重复、随机的荧光闪烁特性。通常, 适用 SOFI 成像的探针包括荧光蛋白(FP)、无机量子点(Quantum Dots, Qdots)以及有及有机荧光小分子(Organic Dyes)等。2009年, T. Dertinger 等使用具有荧光闪烁特性的 Qdots625 对 Hela 细胞微管结构进行特异性标记并在国际上首次实现

了 SOFI 成像应用^[70], 此后一段时间内, 研究人员通过 Qdots525、Qdots705 以及 Qdots800 等对 SOFI 成像从技术上优化, 实现了通过计算 n 阶累积量得到 n 倍的分辨率提升, 以及发展了高密度标记的 JT-SOFI 等技术等^[67, 69, 72]。

5.1 用于 SOFI 的荧光材料

可逆光开关荧光蛋白(RSFPs)是超分辨显微成像技术中的一种常用荧光探针, 成为国际上的研究热点。其中以绿色可逆光开关荧光蛋白 Dronpa 为代表的 RSFPs 被广泛地应用在全类超分辨显微成像中, 例如 RESOLFT、PALM、SOFI 等超分辨显微成像以及各类生物问题研究中^[73]。Dronpa 的最大激发波长约为 500 nm, 最大发射波长约为 520 nm, 在 488 nm 光的照射下, Dronpa 由绿色的亮态转变为暗态, 随后在 405 nm 光的照射下可迅速恢复至亮态, 继续发出绿色荧光, 这一过程可以转化多次, 从而通过不同波长的光实现反复光开关功能。对于荧光蛋白的活细胞 SOFI 超分辨显微成像, 2012 年, Peter Dedecker 首次提出利用 Dronpa 和红色可逆光开关荧光蛋白 rsTagRFP 实现双色活细胞 SOFI 超分辨显微成像^[74]。

目前, RSFPs 的品种较为单一, 常用的绿色 RSFPs Dronpa 的荧光光子数较低, 光学稳定性有待提高^[74]。Sun 等人选择了单分子光子数更高的光转化蛋白 mEos 3.1 作为模板^[75], 对 His62 位点进行饱和位点突变, 获得了更适合用于活细胞 SOFI 的荧光蛋白 Skyllan-S, 实验结果表明 Skyllan-S 的亮度是 Dronpa 的 1.15 倍, 光稳定相比 Dronpa 更加优异, 并且荧光波动范围更大, 在多项参数上超越 Dronpa 成为新一代活细胞 SOFI 成像的荧光探针^[76]。

为了使 SOFI 显微术可以与有机荧光染料兼容, Dertinger 等人使用和 dSTORM 相同的条件, 使用 EMCCD 作为探测器, 在光照射下具有快速荧光闪烁性质的 Alexa647 作为荧光探针。在 20 Hz 的帧率下拍摄 1 000 张 Alexa-647 偶联抗体标记的 COS-7 细胞 β -微管。使用 SOFI 算法运算处理之后, 得到的图像表明, SOFI 技术可以在较低的成像时间上获得具有低背景、高分辨率的荧光图像^[77]。

基于单分子定位的超分辨成像技术已经能够显著提升空间分辨率;然而,当多个荧光分子靠近之后,其光开关过程的区分会受到限制,从而导致不能够高密度标记亚细胞结构限制了对活细胞成像。为了解决这个问题,Xi 等人发展了一种联合标记超分辨技术(JT-SOFI),从而实现高密度标记且不影响目标结构的分辨率和结构的完整性。为了获得超高密度标记,他们使用具有不同发射波长的市售量子点 QD525、QD625 和 QD705 来共同标记 COS-7 细胞中的微管蛋白(图 25)。在分析了具有窄带发射光谱宽度的 QD 标记的荧光闪烁图像之后,在亚衍射分辨率下精确的获得了微管网络的高对比度图像。与 SOFI 相反,JT-SOFI 提供了一个高分辨率的连续微管网络结构,每个通道只有 100 帧,从而提高了时间分辨率^[72]。

聚合物量子点(Pdots)作为新一代优秀的生物荧光探针在荧光成像示踪分析技术中得到广泛的应用。此前,受限于众多因素,Pdots 从未实现过超分辨成像。为了实现高量子产率,超高光稳定性和优异的生物兼容性的荧光探针,同时满足超分辨成像的要求,Wu 和合作者 Sun 等人成功设计制备了小尺寸光闪烁半导体聚合物量子点,特异性地对生物亚细胞结构进行高密度标记,取得超分辨率光学涨落成像(SOFI)结果。Pdots 的荧光闪烁特性主要源于聚合物分子内的能量迁移的动态过程(主要是空穴极化子对荧光的淬灭^[78-79])。因此,Pdots 的尺寸、形貌、激子动力学以及能量传递过程等因素都会影响其荧光闪烁特性。前期的单粒子荧光性质研究表明,尺寸大于 15 nm 的 Pdots 表现出连续稳定的荧光动态过程;而 10 nm 左右的小尺寸 Pdots 表现出具有明显的荧光闪烁(Photoblinking)特性^[80-82]。该工作选用两种具有较高荧光强度的聚合物 PFBT 和 CN-PPV(如图 16 所示,分子 58,59)。通过优化传统的纳米再沉淀法制备出分布较均一的两种小尺寸 Pdots,均表现出较高的荧光亮度以及荧光闪烁特性。单粒子荧光实验统计表明,两种小尺寸 Pdots 的 Off-time 间隔符合 Power-law 分布。通过优化标记,该工作还实现了高密度的亚细胞结构标记和超分辨成像结果。小尺寸光闪烁聚合物量子点

有望大大提高超分辨成像的时空分辨率,减少光毒性,实现长时间超分辨成像(如图 16 所示)^[83]。

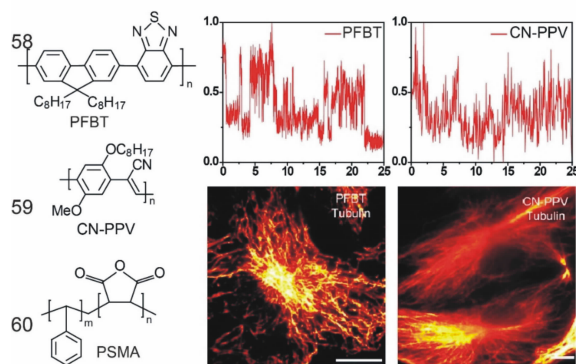


图 16 聚合物荧光探针分子 58~59 化学结构式,荧光闪烁特性和单色细胞微管标记图像^[83]

Fig. 16 Chemical structure and photoblinking property of fluorescent polymer probe molecules (58 ~ 59), single-color microtubule images labelled with polymer dots^[83]

为了能够实现高通量多通道实时的亚细胞结构的超分辨荧光成像,研究团队通过高通量筛选并调控制备方法,成功制备出具有闪烁特性的小尺寸 Pdots。PFO 和 PFTBT5 Pdots(分子 61,62)具有较窄荧光光谱(半高全宽分别为 40 nm 和 70 nm)、较好的生物兼容性以及较高的光稳定性。此外,由于 PFTBT5 的聚合物骨架中引入了二噻吩基苯并噻二唑的受体基团,使其能够在 488 nm 激光的激发下发射红色荧光。与单色(PFBT 和 CN-PPV)SOFI 相比,PFO 与 PFTBT5 Pdots 具有不同的激发波长,且其荧光光谱无交叠,这就为实现基于 Pdots 的双色 SOFI 实验提供了可能。

PFO 与 PFTBT5 的单粒子荧光性质结果表明在相应的激发光激发下二者均具有明显的荧光闪烁特性。统计表明,PFO 和 PFTBT5 Pdots 的 Off-Time 间隔符合 Power-law 分布,适用于基于荧光涨落的 SOFI 成像技术。通过优化蛋白标记,该团队实现了不同种类 Pdots 对不同亚细胞结构(微观结构,网格蛋白有被小窝,线粒体膜)的高密度标记并实现双色超分辨成像。实验结果表明,Pdots 标记的网格蛋白有被小窝的超分辨成像结果与传统荧光成像结果分辨率相比具有 1.89 倍

的提升,微管结构的双色 SOFI 结果表明,其分辨率具有 1.93 倍的提升(如图 17 所示)^[84]。

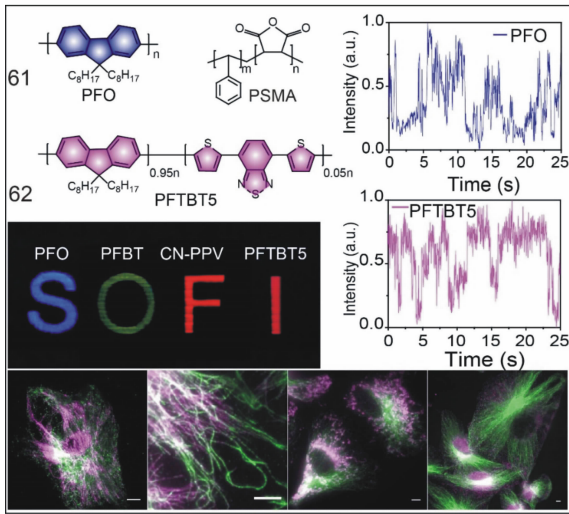


图 17 聚合物荧光探针分子 61 ~ 62 化学结构式, 荧光闪烁特性和细胞微管多色标记图像^[84]

Fig. 17 Chemical structure and photoblinking property of fluorescent polymer probe molecules (61 ~ 62), multi-color microtubule images labelled with polymer dots^[84]

6 结构光照明成像 (SIM/SSIM)

2000 年, Gustafsson 教授首次提出 SIM^[22-23]。SIM 是基于激光的宽场显微镜, 在入射激光光路中配置可移动的衍射光栅使入射光在物镜焦平面产生强度分布为正弦形式的衍射条纹。成像过程中, 通过条纹形状の入射光与物体不同角度之间的混频形成摩尔条纹。将原本在成像过程中物镜对物体损失的高频信息(物体的细节信息)的损失通过形成摩尔条纹以低频信息(包含有原来物体的细节信息)的方式来记录。经过在频域的变换, 以高分辨率的形式重建出物体细节成分。SIM 成像需要拍摄物体焦平面不同角度的图像以便后期处理过程能够完整呈现出被拍摄物体的细节信息。通常, SIM 比传统宽场显微镜能够提高一倍的分辨率。2005 年, Gustafsson 教授提出饱和结构光照明成像(SSIM), 将结构光的条纹间隔压窄以得到更高的分辨率, 如图 18 所示。

从 SIM 的工作原理可知, SIM 成像对所拍摄

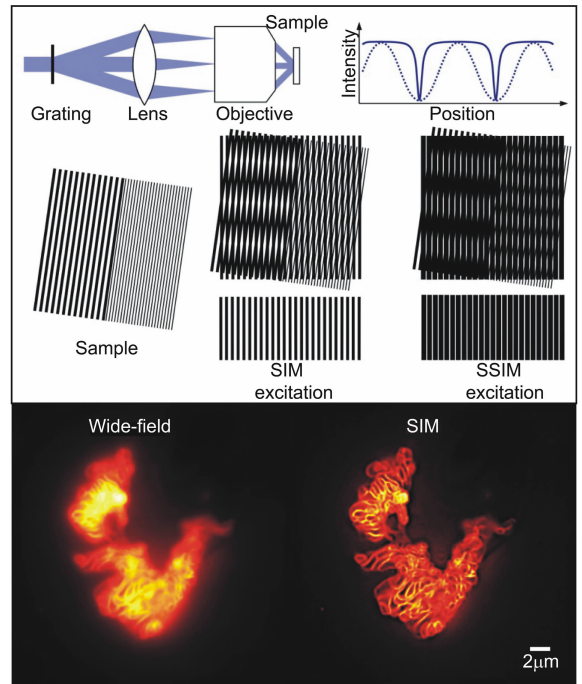


图 18 SIM/SSIM 原理图, 宽场显微镜和 SIM 显微镜下 GFP 标记的 COS-7 细胞线粒体结构图

Fig. 18 Principle photos of SIM and SSIM. GFP-stained mitochondria in COS-7 cells imaged with conventional wide-field and structured illumination microscopy

物体的荧光探针无特殊的要求。因此本文不对 SIM 成像所需的探针进行总结。

7 总结与展望

超分辨成像技术的出现打破了经典的阿贝光学衍射极限理论, 使得传统光学显微镜可以以纳米尺度的空间分辨率对亚细胞精细结构、生物大分子空间构象以及动态过程成像。超分辨成像技术极大地推动了生命科学的进步, 已然成为科学研究中不可缺少的重要的工具。这些技术的发展离不开各科研团队的不懈努力, 从不同的角度实现了超分辨率成像。对于通过外加一圈环状激光来压缩调制点扩散函数的超分辨技术, 最常用的是以 Hell 从理论提出并实现的受激发射损耗荧光显微镜(STED), 通过不断地对系统的优化以及对荧光探针的不断开发, 最终使得 STED 荧光显微镜在生物学研究实现了超高的分辨率。当然,

通过调制 PSF 的技术并不限于 STED,还包括基态损耗显微镜(GSD)等超分辨技术。基于单分子定位技术的超分辨荧光显微镜(PALM、STORM)在近些年同样取得了全面的发展并为生物学家提供了精细的亚细胞结构,在细胞动态过程的研究中发挥了重要的作用。此外,基于探针荧光涨落的超分辨光学涨落成像(SOFI)技术凭借其优异的时空分辨率、成像深度以及较低的光毒性,成为活细胞结构和生物功能超分辨成像家族的优秀成员。

目前主流的超分辨率成像方式已经在生命科学的研究中扮演了举足轻重的角色。这些技术的实现都离不开对成像探针的不断发展及优化。虽然目前常用的超分辨率荧光成像已经取得一系列研究成果,使得科学家们能够以空前的分辨率去探究生物学过程。但是,目前主流的荧光成像探针仍然存在进一步提升的空间。比如,通常应用到 PALM 和 STORM 的荧光蛋白具有内源性,且具有较好的光转换、光激活性质,但是与其他的有机染料等荧光分子相比,其发射光子数目远远不及其他的荧光探针,给成像的对比度以及时间分辨率带来一定的限制。通常用到超分辨荧光显微镜中的罗丹明衍生物、香豆素衍生物和花青衍生物等有机染料荧光探针具有较高光子数和光子发射效率。然而,有机小分子荧光探针的光稳定性仍然有待进一步的提高。目前常用的有机荧光探针在长时间的成像过程中,仍然需要合适的除氧

系统或者是合适的成像缓冲溶液的辅助。对于无机量子点(Qdots)作为生物荧光探针而言,其可调的发射光谱、较宽的吸收光谱、较高的量子效率等优异的光学性质在光学超分辨成像探针中也有着诸多的应用。非核-壳结构的 Qdots 表现出的随机荧光闪烁性质恰好符合新兴的超分辨光学涨落成像(SOFI)技术对荧光探针的要求。然而,即便是通过各种方式的修饰或改造,常用的 Qdots 中的重金属离子所引起的生物毒性仍然是个值得关注的问题。近期应用到 SOFI 的聚合物量子点(Pdots),具备了传统荧光探针各项优异的光学性质,通过调控 Pdots 的结构及材料尺寸,可以得到具有随机闪烁特性的 Pdots 荧光探针。对于 Pdots 荧光探针在超分辨成像中的应用而言,目前只适用于 SOFI 以及对成像探针要求不苛刻的 SIM 成像中,因此在空间分辨率提升的方面仍有一定的空间。对于打破传统的光学衍射极限,科学家们都展示出了极大的兴趣。除了本文中着重列举了发展的较早且技术较为成熟的几类超分辨成像技术,近两年的另一类超分辨成像技术正在受到人们的关注。科学家从生物样品本身出发,通过一定的方式让生物样品实现膨胀实现超分辨率成像。因此,随着超分辨技术的不断扩增,对生物荧光探针的需求仍然日益增长。设计开发光学性能优异、无生物毒性、普适性强的超分辨成像荧光探针仍是富有挑战的研究课题。

参考文献:

- [1] FERRARI M. Cancer nanotechnology: opportunities and challenges[J]. *Nature Reviews;Cancer*,2005,5(3):161-171.
- [2] NIE S,XING Y,KIM G J,*et al.*. Nanotechnology applications in cancer[J]. *Annual Review of Biomedical Engineering*,2007,9:257-288.
- [3] BEN N G GIEPMANS,STEPHEN R ADAMS,MARK H ELLISMAN,*et al.*. The fluorescent toolbox for assessing protein location and function[J]. *Science*,2006,312(217):224.
- [4] LI G W,XIE X S. Central dogma at the single-molecule level in living cells[J]. *Nature*,2011,475(7356):308-315.
- [5] XIE X. S,YU J,YANG W Y. Living cells as test tubes[J]. *Science*,2006,312:228-230.
- [6] ABBE E. Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung[J]. *Archiv Für Mikroskopische Anatomie*,1873,9(1):413-418.
- [7] KLEIN T,PROPPERT S,SAUER M. Eight years of single-molecule localization microscopy[J]. *Histochemistry and Cell Biology*,2014,141(6):561-575.
- [8] STEFAN W. H,WICHMANN J. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission stimulated emission depletion fluorescence microscopy[J]. *Optics Letters*,1994,19(11):780-782.
- [9] GAEL M,REBECCA M,BIRKA H,*et al.*. Fast STED microscopy with continuous wave fiber lasers[J]. *Optics Express*,

2010,18(2):1302-1309.

- [10] SUSANNE S, THORSTEN S, RITTWEGER E, *et al.*. STED nanoscopy with mass-produced laser diodes[J]. *Optics Express*, 2011, 19(9):8066-8072.
- [11] ROUBINET B, MARIANO L. B, PHILIPP A, *et al.*. Carboxylated photoswitchable diarylethenes for biolabeling and super-resolution RESOLFT microscopy[J]. *Angew Chem. Int. Ed. Engl.*, 2016, 55:15429-15433.
- [12] BOHM U, HELL S W, SCHMIDT R. 4Pi-RESOLFT nanoscopy[J]. *Nat. Commun.*, 2016, 7:10504.
- [13] HOFMANN M, EGGELING C, JAKOBS S, *et al.*. Breaking the diffraction barrier in fluorescence microscopy at low light intensities by using reversibly photoswitchable proteins[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005, 102(49):17565-17569.
- [14] BETZIG E, PATTERSON G H, SOUGRAT R, *et al.*. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution [J]. *Science*, 2006, 313(5793):1642-1645.
- [15] LEGANTW R, SHAO L, GRIMM J B, *et al.*. High-density three-dimensional localization microscopy across large volumes [J]. *Nature Methods*, 2016, 13:359-365.
- [16] EN CAI, KYLE MARCHUK, PETER BEEMILLER, *et al.*. Visualizing dynamic microvillar search and stabilization during ligand detection by T cells[J]. *Science*, 2017, 356:598.
- [17] RUST M J, BATES M, ZHUANG X. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM) [J]. *Nat Methods*, 2006, 3(10):793-795.
- [18] VAN D L S, LOSCHBERGER A, KLEIN T, *et al.*. Direct stochastic optical reconstruction microscopy with standard fluorescent probes[J]. *Nat. Protoc.*, 2011, 6(7):991-1009.
- [19] DERTINGER T, COLYER R, IYER G, *et al.*. Fast, background-free, 3D super-resolution optical fluctuation imaging (SOFI) [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2009, 106(52):22287-22292.
- [20] COX S, ROSTEN E, MONYPENNY J, *et al.*. Bayesian localization microscopy reveals nanoscale podosome dynamics[J]. *Nat. Methods*, 2011, 9(2):195-200.
- [21] CHEN X Z, WEI M, ZHENG M M, *et al.*. Study of RNA polymerase II clustering inside live-cell nuclei using bayesian nanoscopy[J]. *ACS Nano*, 2016, 10(2):2447-2454.
- [22] GUSTAFSSON M G L. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy [J]. *Journal of Microscopy*, 2000, 192:82-87.
- [23] GUSTAFSSON M G. Nonlinear structured-illumination microscopy: wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005, 102(37):13081-13086.
- [24] HELL T A K S W. Subdiffraction resolution in far-field fluorescence microscopy [J]. *Optics Letters*, 1999, 24(14):954-956.
- [25] HEIN B, WILLIG K I, HELL S W. Stimulated emission depletion (STED) nanoscopy of a fluorescent protein-labeled organelle inside a living cell [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008, 105(38):14271-14276.
- [26] ALEXEY N BUTKEVICH, GYUZEL YU MITRONOVA, SVEN C SIDENSTEIN, *et al.*. Fluorescent rhodamines and fluorogenic carbopyronines for super-resolution STED microscopy in living cells [J]. *Angew Chem. Int. Ed. Engl.*, 2016, 55:3290-3294.
- [27] BORDENAVE M D, BALZAROTTI F, STEFANI F D, *et al.*. STED nanoscopy with wavelengths at the emission maximum [J]. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 2016, 49(36):365102.
- [28] GOTTFERT F, PLEINER T, HEINE J, *et al.*. Strong signal increase in STED fluorescence microscopy by imaging regions of subdiffraction extent [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2017, 114(9):2125-2130.
- [29] HELL S W, KROUG M. Ground-state-depletion fluorescence microscopy: a concept for breaking the diffraction resolution limit [J]. *Applied Physics B*, 1995, 60(5):495-497.
- [30] JOANNA O, ADOLFSSON K, WESTPHAL V, *et al.*. Ground state depletion nanoscopy resolves semiconductor nanowire barcode segments at room temperature [J]. *Nano Letters*, 2017, 17(4):2652-2659.
- [31] WURM C A, KOLMAKOV K, GOTTFERT F, *et al.*. Novel red fluorophores with superior performance in STED microscopy [J]. *Optical Nanoscopy*, 2012, 1(1):7.

- [32] SCHILL H, NIZAMOV S, BOTTANELLI F, *et al.*. 4-Trifluoromethyl-substituted coumarins with large Stokes shifts: synthesis, bioconjugates, and their use in super-resolution fluorescence microscopy[J]. *Chemistry*, 2013, 19(49):16556-16565.
- [33] ERDMANN R S, TAKAKURA H, THOMPSON A D, *et al.*. Super-resolution imaging of the Golgi in live cells with a bioorthogonal ceramide probe[J]. *Angew Chem. Int. Ed. Engl.*, 2014, 53(38):10242-10246.
- [34] LUKINAVICIUS G, REYMOND L, D'ESTE E, *et al.*. Fluorogenic probes for live-cell imaging of the cytoskeleton[J]. *Nat. Methods*, 2014, 11(7):731-733.
- [35] D'ESTE E, KAMIN D, GOTTFERT F, *et al.*. STED nanoscopy reveals the ubiquity of subcortical cytoskeleton periodicity in living neurons[J]. *Cell Rep.*, 2015, 10(8):1246-1251.
- [36] KOLMAKOV K, HEBISCH E, WOLFRAM T, *et al.*. Far-red emitting fluorescent dyes for optical nanoscopy: fluorinated Silicon-Rhodamines (SIRF Dyes) and phosphorylated oxazines[J]. *Chemistry*, 2015, 21(38):13344-13356.
- [37] KASPER R, HARKE B, FORTHMANN C, *et al.*. Single-molecule STED microscopy with photostable organic fluorophores[J]. *Small*, 2010, 6(13):1379-1384.
- [38] GRAZVYDAS L, REYMOND L, UMEZAWA K, *et al.*. Fluorogenic probes for multicolor imaging in living cells[J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2016, 138:9365-9368.
- [39] HANNE J, FALK H J, GORLITZ F, *et al.*. STED nanoscopy with fluorescent quantum dots[J]. *Nat. Commun.*, 2015, 6:7127.
- [40] AHMET YILDIZ, JOSEPH N FORKEY, SEAN A MCKINNEY, *et al.*. Myosin V walks hand-over-hand_ single fluorophore imaging with 1.5-nm localization[J]. *Science*, 2003, 300(27):2061-2065.
- [41] ALISTAIR N. BOETTIGER, BOGDAN BINTU, JEFFREY R. MOFFITT, *et al.*. Super-resolution imaging reveals distinct chromatin folding for different epigenetic states[J]. *Nature*, 2016.
- [42] BELIVEAU B J, BOETTIGER A N, AVENDANO M S, *et al.*. Single-molecule super-resolution imaging of chromosomes and in situ haplotype visualization using Oligopaint FISH probes[J]. *Nat. Commun.*, 2015, 6:7147.
- [43] VISWANATHAN S, WILLIAMS M E, BLOSS E B, *et al.*. High-performance probes for light and electron microscopy[J]. *Nat. Methods*, 2015, 12(6):568-576.
- [44] ZHANG X, ZHANG M S, DONG L, *et al.*. Highly photostable, reversibly photoswitchable fluorescent protein with high contrast ratio for live-cell superresolution microscopy[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016.
- [45] LEE H-L D, LORD S J, SHIGEKI I, *et al.*. Superresolution imaging of targeted proteins in fixed and living cells using photoactivatable organic fluorophores[J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, 132:15099-15101.
- [46] LEE M K, WILLIAMS J, TWIEG R J, *et al.*. Enzymatic activation of nitro-aryl fluorogens in live bacterial cells for enzymatic turnover-activated localization microscopy[J]. *Chemical Science*, 2013, 42:220-225.
- [47] FOLLING J, BELOV V, KUNETSKY R, *et al.*. Photochromic rhodamines provide nanoscopy with optical sectioning[J]. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2007, 46(33):6266-6270.
- [48] BOSSI M, FOLLING J, BELOV V N, *et al.*. Multicolor far-field fluorescence nanoscopy through isolated detection of distinct molecular species[J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, 130(8):2463-2468.
- [49] GRIMM J B, SUNG A J, LEGANT W R, *et al.*. Carbofluoresceins and carborhodamines as scaffolds for high-contrast fluorogenic probes[J]. *ACS Chem. Biol.*, 2013, 8(6):1303-1310.
- [50] DENIZ E, TOMASULO M, CUSIDO J, *et al.*. Photoactivatable fluorophores for super-resolution imaging based on oxazine auxochromes[J]. *The Journal of Physical Chemistry C*, 2012, 116(10):6058-6068.
- [51] TIAN Z, LI A D, HU D. Super-resolution fluorescence nanoscopy applied to imaging core-shell photoswitching nanoparticles and their self-assemblies[J]. *Chem. Commun. (Camb)*, 2011, 47(4):1258-1260.
- [52] ZHANG H, WANG C, JIANG T, *et al.*. Microtubule-targetable fluorescent probe: site-specific detection and super-resolution imaging of ultratrace tubulin in microtubules of living cancer cells[J]. *Anal. Chem.*, 2015, 87(10):5216-5222.
- [53] LI C, HU Z, ALDRED M P, *et al.*. Water-soluble polymeric photoswitching dyads impart super-resolution lysosome high-

- lighters[J]. *Macromolecules*,2014,47(24):8594-8601.
- [54] BATES M, HUANG B, DEMPSEY G T, *et al.*. Multicolor Super-Resolution Imaging with Photo-Switchable Fluorescent Probes[J]. *Science*,2007,317:1749-1753.
- [55] HUANG B, WANG W, BATES M, *et al.*. Three-dimensional super-resolution imaging by stochastic optical reconstruction microscopy[J]. *Science*,2008,319:810-813.
- [56] HEILEMANN M, VAN D L S, SCHUTTPELZ M, *et al.*. Subdiffraction-resolution fluorescence imaging with conventional fluorescent probes[J]. *Angew Chem. Int. Ed. Engl.*,2008,47(33):6172-6176.
- [57] GRAHAM T DEMPSEY, BATES M, WALTER E KOWTONIUK, *et al.*. Photoswitching mechanism of cyanine dyes[J]. *J. Am. Chem. Soc.*,2009,131:18192-18193.
- [58] VAUGHAN J C, DEMPSEY G T, SUN E, *et al.*. Phosphine quenching of cyanine dyes as a versatile tool for fluorescence microscopy[J]. *J. Am. Chem. Soc.*,2013,135(4):1197-2000.
- [59] FU N, XIONG Y, SQUIER T C. Synthesis of a targeted biarsenical Cy3-Cy5 affinity probe for super-resolution fluorescence imaging[J]. *J. Am. Chem. Soc.*,2012,134(45):18530-18533.
- [60] GUNSOLUS I L, HU D, MIHAI C, *et al.*. Facile method to stain the bacterial cell surface for super-resolution fluorescence microscopy[J]. *Analyst*,2014,139(12):3174-3178.
- [61] CHIEN M P, CARLINI A S, HU D, *et al.*. Enzyme-directed assembly of nanoparticles in tumors monitored by in vivo whole animal imaging and ex vivo super-resolution fluorescence imaging[J]. *J. Am. Chem. Soc.*,2013,135(50):18710-18713.
- [62] HEILEMANN M, VAN D L S, MUKHERJEE A, *et al.*. Super-resolution imaging with small organic fluorophores[J]. *Angew Chem. Int. Ed. Engl.*,2009,48(37):6903-6908.
- [63] LUKINAVICIUS G, UMEZAWA K, OLIVIER N, *et al.*. A near-infrared fluorophore for live-cell super-resolution microscopy of cellular proteins[J]. *Nat. Chem.*,2013,5(2):132-139.
- [64] UNO S N, KAMIYA M, YOSHIHARA T, *et al.*. A spontaneously blinking fluorophore based on intramolecular spirocyclization for live-cell super-resolution imaging[J]. *Nat. Chem.*,2014,6(8):681-689.
- [65] SCHAFFER P, VAN D L S, LEHMANN J, *et al.*. Methylene blue- and thiol-based oxygen depletion for super-resolution imaging[J]. *Anal. Chem.*,2013,85(6):3393-3400.
- [66] LEE S F, VEROLET Q, FURSTENBERG A. Improved super-resolution microscopy with oxazine fluorophores in heavy water[J]. *Angew Chem. Int. Ed. Engl.*,2013,52(34):8948-8951.
- [67] DERTINGER T, RYAN C, VOGEL R, *et al.*. Achieving increased resolution and more pixels with SOFI[J]. *Optics Express*,2010,18(18):18875-18885.
- [68] GEISSBUEHLER S, DELLAGIACOMA C, LASSER T. Comparison between SOFI and STORM[J]. *Optics Express*,2011,2(3):408-420.
- [69] GEISSBUEHLER S, BOCCHIO N L, DELLAGIACOMA C, *et al.*. Mapping molecular statistics with balanced super-resolution optical fluctuation imaging(bSOFI)[J]. *Optical Nanoscopy*,2012,1:1-7.
- [70] GEISSBUEHLER S, SHARIPOV A, GODINAT A, *et al.*. Live-cell multiplane three-dimensional super-resolution optical fluctuation imaging[J]. *Nat. Commun.*,2014,5:5830.
- [71] WANG X H, CHEN D N, YU B, *et al.*. Deconvolution optimization in super-resolution optical fluctuation imaging based on cumulant standard deviation[J]. *Acta Physica Sinica*,2016,65:198701.
- [72] ZENG Z P, CHEN X Z, WANG H, *et al.*. Fast super-resolution imaging with ultra-high labeling density achieved by joint tagging super-resolution optical fluctuation imaging[J]. *Sci. Rep.*,2015,5:8359.
- [73] HABUCHI S, ANDO R, DEDECKER P, *et al.*. Reversible single-molecule photoswitching in the GFP-like fluorescent protein Dronpa[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*,2005,102(27):9511-9516.
- [74] DEDECKER P, MO G C, DERTINGER T, *et al.*. Widely accessible method for superresolution fluorescence imaging of living systems[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*,2012,109(27):10909-10914.
- [75] ZHANG M, CHANG H, ZHANG Y, *et al.*. Rational design of true monomeric and bright photoactivatable fluorescent pro-

- teins[J]. *Nat. Methods*,2012,9(7):727-729.
- [76] ZHANG X, CHEN X Z, ZENG Z P, *et al.*. Development of a reversibly switchable fluorescent protein for super-resolution optical fluctuation imaging(SOFI)[J]. *ACS Nano*,2015,9(3):2659-2667.
- [77] DERTINGER T, HEILEMANN M, VOGEL R, *et al.*. Superresolution optical fluctuation imaging with organic dyes[J]. *Angew Chem. Int. Ed. Engl.*,2010,49(49):9441-9443.
- [78] DAVID A. VANDEN B, WAI T Y, HU D H, *et al.*. Discrete intensity jumps and intramolecular electronic energy transfer in the spectroscopy of single conjugated polymer molecule[J]. *Science*,1997,277:1074-1077.
- [79] BARBARA P F, GESQUIERE A J, PARK S J, *et al.*. Single-molecule spectroscopy of conjugated polymers[J]. *Acc. Chem. Res.*,2005,38:602-610.
- [80] WU C F, CHIU D T. Highly fluorescent semiconducting polymer dots for biology and medicine[J]. *Angew Chem. Int. Ed. Engl.*,2013,52(11):3086-3109.
- [81] WU C F, SZYMANSKI C, CAIN Z, *et al.*. Conjugated polymer dots for multiphoton fluorescence imaging[J]. *J. Am. Chem. Soc.*,2007,129:12904-12905.
- [82] WU C F, BARBARA B, SZYMANSKI C, *et al.*. Multicolor conjugated polymer dots for biological fluorescence imaging [J]. *ACS Nano*,2008,2(11):2415-2423.
- [83] CHEN X Z, LI R Q, LIU Z H, *et al.*. Small Photoblinking Semiconductor Polymer Dots for Fluorescence Nanoscopy[J]. *Advanced Materials*,2017,29(5).
- [84] CHEN X Z, LIU Z H, LI R Q, *et al.*. Multicolor super-resolution fluorescence microscopy with blue and carmine small photoblinking polymer dots[J]. *ACS Nano*,2017.

作者简介:



刘志贺(1992—),男,辽宁朝阳人,博士研究生,2016年获得吉林大学硕士学位,主要从事超分辨荧光成像及荧光探针方面的研究。E-mail: liuzhihe002@163.com



吴长锋(1976—),男,山东德州人,博士,教授,博士生导师。主要从事半导体聚合物点(Polymer Dot)作为新型生物荧光探针的研究,拓展聚合物点在超分辨细胞成像、活体成像、生物传感器、光动力学治疗等领域的应用。E-mail: wucf@sustc.edu.cn