

细胞器超分辨成像荧光染料

江文钊^{1,2}, 徐兆超^{1,2}

(1 中国科学院大连化学物理研究所, 分离分析化学重点实验室, 辽宁 大连 116023; 2 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 超分辨显微镜提供超越传统光学显微镜衍射极限的成像能力, 彻底改变了细胞生物学领域研究。在这一背景下, 具有光稳定性、易于修饰和荧光开关可调等独特性能的有机小分子染料获得了新的发展机遇。聚焦于不同细胞器超分辨成像荧光染料, 总结了目前可用的超分辨荧光探针的设计和靶向策略。首先简要介绍了三种主要的超分辨成像技术, 包括结构光照明显微镜技术、受激发射损耗显微技术和单分子定位成像技术, 以及它们对荧光染料性能的不同要求, 并介绍了近五年来用于线粒体、溶酶体、细胞膜、脂滴和细胞核的超分辨成像的荧光染料。最后讨论了该领域当前所面临的挑战。

关键词: 荧光染料; 超分辨成像; 荧光探针; 细胞器; 动态

中图分类号: O 657.3

文献标志码: A

文章编号: 0438-1157 (2024) 04-1333-22

Fluorescent dyes for super-resolution imaging of organelles

JIANG Wenchao^{1,2}, XU Zhaochao^{1,2}

(¹ CAS Key Laboratory of Separation Science for Analytical Chemistry, Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, Liaoning, China; ² University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: Super-resolution microscopy has revolutionized the field of cell biology by providing enhanced imaging capabilities that surpass the diffraction limit of conventional light microscopy. In this context, organic small molecule dyes with unique properties such as photostability, ease modification, and tunable fluorescence switching have gained new development opportunities. This review focuses on fluorescent dyes for super-resolution imaging of different cellular organelles and summarizes the design and targeting strategies of currently available super-resolution fluorescent probes. The paper begins by briefly introducing three major super-resolution imaging techniques, including structured illumination microscopy, stimulated emission depletion microscopy, and single-molecule localization microscopy, and their diverse requirements for the performance of fluorescent dyes. It also highlights fluorescent dyes used in super-resolution imaging of mitochondria, lysosomes, cell membranes, lipid droplets, and nucleus over the past five years. Finally, the article discusses the future challenges in this field.

Key words: fluorescent dyes; super-resolution imaging; fluorescent probes; organelles; dynamics

引 言

染料是一类重要的精细化工品, 在纺织印染、

生物医学检测、光电器件等领域发挥着重要作用^[1-2]。从1856年威廉·亨利·珀金发明第一个人工合成染料苯胺紫开始, 染料的主要功能是用于纺织

收稿日期: 2023-12-26 修回日期: 2024-02-18

通信作者: 徐兆超 (1979—), 男, 博士, 研究员, zcxu@dicp.ac.cn

第一作者: 江文钊 (1994—), 男, 博士研究生, jiangwc2018@dicp.ac.cn

基金项目: 国家自然科学基金项目 (22225806, 22078314)

引用本文: 江文钊, 徐兆超. 细胞器超分辨成像荧光染料[J]. 化工学报, 2024, 75(4): 1333-1354

Citation: JIANG Wenchao, XU Zhaochao. Fluorescent dyes for super-resolution imaging of organelles[J]. CIESC Journal, 2024, 75(4): 1333-1354

品染色,中国也一直是世界上最大的纺织印染制造国。从20世纪40年代开始,染料与抗体结合作为开端逐渐被用于生物样本染色(包括细胞、组织和活体)。其中最具代表性的生物染色有机染料有以下几种:荧光素异硫氰酸酯(fluorescein isothiocyanate, FITC)与抗体的点击偶联反应用于细胞和组织染色,由于在生物和医学中的广泛使用, FITC也被用作荧光显微镜绿光通道的通用性命名。吖啶菁绿(indocyanine green, ICG)与血红蛋白结合力高被用于血管成像^[3]。近些年来,由于ICG生物毒性低和近红外光发射带来的高组织穿透能力,依靠ICG对肿瘤组织的染色,通过荧光成像引导外科医生准确快速地切除肿瘤组织。这种染料辅助荧光引导手术在诊断和外科手术中具有很大的潜力,并且已经在脑胶质瘤和卵巢癌临床手术中获得应用。用结晶紫来鉴定细菌的革兰氏染色法由丹麦医生汉斯·克里斯蒂安·革兰于1884年发明并沿用至今,这个方法最初是用来鉴别肺炎球菌与克雷白氏肺炎菌之间的关系,后推广为鉴别细菌种类的重要特性之一。革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌对抗生素的反应并不一样,革兰氏法在5 min内就能够确定细菌的革兰氏性质,这对于由细菌感染引起的疾病的临床诊断及治疗有着重要意义。

随着生物医学染色的不断拓展,具有荧光发射的染料获得了格外的重视。荧光具有原位、实时、动态的优势,而染料的结构易化学修饰。从20世纪80年代钱永健发明钙离子探针开始,荧光探针成为染料在生物医学中的最重要的研究方向,并且这种“受体-连接接团-荧光报告基团”的探针结构设计一直沿用至今。获益于荧光环境敏感性的研究,多种多样的识别信号传导机制使得荧光探针的设计丰富多彩。进入21世纪,遗传编码技术和生物正交反应兴起^[4-5],使得荧光染料具有了细胞内定点和专一识别的能力。与此同时,以荧光亮暗“开”“关”转换的时间分辨突破衍射极限为基本原理的超分辨荧光成像技术为荧光染料的发展带来了新的机遇^[6-7],优化荧光团结构提高荧光量子产率和稳定性成为近几年的研究前沿^[8-10]。随之而来的空间和时间分辨率的提高,使得细胞器亚结构的动态成像成为现实,并在揭示生命奥秘中显示出越来越强大的威力。目前已经有多篇文献报道了对不同细胞器的超分辨荧光成像,包括线粒体、细胞膜、溶酶、脂滴和细胞核等^[11-17]。但目前成像空间分辨率还只能

达到20~100 nm,这与分子水平成像的0.1~1 nm的空间分辨还有很大差距;同时,由于超分辨成像中荧光容易漂白的问题,细胞器的动态超分辨成像一直是一个挑战。本文首先介绍不同超分辨成像技术的原理,然后按照细胞器的类型介绍荧光探针的进展,重点是希望通过讨论荧光染料在细胞器超分辨成像中的性能需求和当前应用局限,为未来细胞器超分辨成像荧光染料的发展提供思路。

1 超分辨成像原理及染料的性能要求

1.1 STED 成像原理及染料要求

受激发射损耗(stimulated emission depletion, STED)显微镜是一种突破光学衍射极限的远场光学显微技术。STED显微镜利用受激辐射效应压缩发光点的点扩展函数(point spread function, PSF),通过对荧光团明暗状态的光学调节来实现超分辨成像。具体原理如图1(a)所示。该技术需要提供两束激光:一束激发光,一束损耗光。激发光首先被用来激发荧光团,产生从基态(S_0)到激发单线态(S_1)的电子跃迁。然后,“面包圈”损耗光束被用来淬灭外围荧光,减少PSF的有效尺寸,获得优越的成像分辨率,其横向分辨率和纵向分辨率分别可以达到20~70 nm和40~150 nm^[18]。理论上所有的荧光发色团均能发生受激辐射以得到STED超分辨成像,但是由于该技术利用两束激光,因此荧光染料的发射峰应与激发和耗尽光束的波长相匹配,以确保效果最大化。此外,高强度的损耗光容易造成染料光漂白,为了获得优异的长时间成像,荧光染料必须具有高亮度和高光稳定性,以确保它们能够经历多次激发和损耗循环而不会发生明显的光漂白。

1.2 SIM 成像原理及染料要求

结构光照明显微(structure illumination microscopy, SIM)技术是一种提高宽视场显微镜横向分辨率的干涉技术。如图1(b)所示,该方法利用图像的空间频率,通过莫尔效应获得分辨率扩展。SIM技术将成像获得的低频信息与已知空间分布函数的照明结构光相结合,计算样品精细结构的高频信息,从而提高光学成像系统的分辨率,突破衍射极限达到100 nm。虽然SIM成像的空间分辨率相比其他超分辨技术的提升小,但是由于其低的激发光强度以及快速的图像采集速度,在活细胞的动态

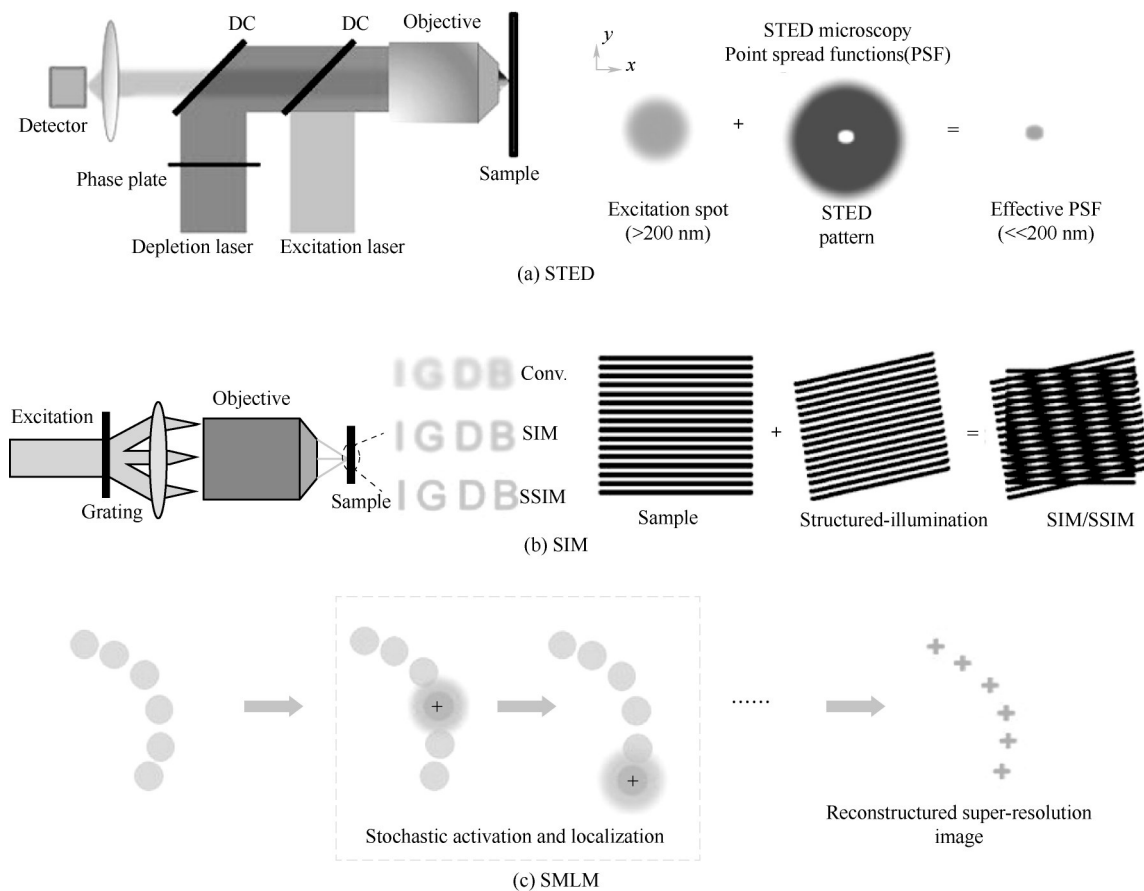


图1 超分辨成像技术原理图^[18-20]

Fig.1 Principles of super-resolution imaging technology^[18-20]

成像上具有巨大的优势。随着SIM技术的发展,目前已经开发出具有50 nm成像分辨率和更快成像速度的SIM成像^[19]。相比于STED成像的强激光对荧光团的稳定性有非常高的要求,SIM成像的激光相对低,但是由于SIM成像需要采集9张图片得到1张重构的超分辨图片,因此为了实现长时间活细胞亚结构的快速动态成像,需要染料具有高亮度及高光稳定性。

1.3 基于单分子的超分辨成像原理及染料要求

除了STED和SIM超分辨成像技术,基于单分子的超分辨成像(single molecule localization microscopy, SMLM)是另一种突破衍射极限的技术。如图1(c)所示,SMLM技术依赖于荧光分子在亮态和暗态之间的随机切换,在激活光下,视野中只有少量的分子被激活处于亮态,减少了荧光点之间干扰的可能性,通过成像算法精确定位单个亮态的荧光团,最后通过合并所有单独激活的荧光团的位置重建超分辨图像。每个荧光团检测到的光子数量决定了定位精度,基于SMLM的成像方法可以获得

10~30 nm横向分辨率的超分辨成像^[20]。这种原理最典型的代表是光激活定位显微成像技术(photoactivated localization microscopy, PALM)和随机光学重构技术(stochastically optical reconstruction microscopy, STORM)。与SIM和STED不同,这种技术对荧光团提出了更高的要求,需要荧光团具有可逆亮暗切换的性质,同时由于单个荧光团的精确定位取决于其光子数,单张超分辨图像需要数千帧荧光的重建,因此需要荧光团具有高亮度和高稳定性。随着研究的创新,同样基于SMLM的点累积用于纳米形貌的成像(points accumulation for imaging in nanoscale topography, PAINT)技术也被报道^[21]。PAINT成像是利用快速可逆结合瞬态染料捕获多个荧光点的过程。它依赖于荧光分子与目标物的随机动态结合,而不是永久结合的荧光团的随机光激活。荧光团与目标物结合时不发光,结合后荧光开启,且染料和目标结合数量稀疏,可以通过多次定位与目标结合的荧光团,来实现超分辨成像。这种技术对染料的光稳定性没有严苛的限制,但是要求

分子与目标结合前后荧光信号差异大,且结合后具有高的单分子亮度,以及与目标物的快速可逆结合动力学。

2 细胞器超分辨成像荧光染料

2.1 细胞器靶向标记

超分辨成像依赖于荧光染料的性能,与荧光蛋白相比,有机荧光染料具有荧光强度高、物理尺寸小、光稳定性高、易于修饰等优点。但是其不具有荧光蛋白通过遗传编码实现的精确标记能力,因此为了实现有机小分子染料对细胞器的特异性标记,需要引入特定的靶向基团。如图2(a)所示是常见的靶向线粒体、溶酶体、细胞核、细胞膜的基团。虽然通过对染料修饰靶向基团可以靶向大多数细胞器,但是现有的靶向基团种类还很有限,限制了荧光染料在成像中的应用。蛋白质标签[图2(b)],如SNAPtags、Halotags的开发,使得小分子-蛋白标签配体组成的荧光探针具有了和荧光蛋白几乎一样的精确标记能力,进一步扩展了小分子荧光团在细胞成像中的应用性。

2.2 线粒体超分辨成像荧光染料

线粒体是真核细胞进行有氧呼吸的主要场所。从结构上,线粒体主要由外膜、内膜、内膜间隙、嵴、线粒体基质、线粒体DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)等组成^[12]。线粒体除了能进行细胞的能量

供应,还参与多种生物学过程,包括脂质代谢、钙离子调控和细胞凋亡等,但是传统的荧光显微镜由于分辨率的限制无法可视化线粒体的纳米级亚结构。为了解析线粒体结构和功能,超分辨成像是实时动态研究线粒体的有利工具。因此研究人员开发了一系列线粒体超分辨染料^[22]。

由于线粒体具有负膜电位和一定脂溶性,因此带正电荷的脂溶性染料分子可以在电势驱动下靶向线粒体,同时脂溶性增强了分子在线粒体上的滞留能力。基于小分子本身的带正电和亲脂性,研究者已经开发出了线粒体嵴和mtDNA的超分辨染料^[23-27]。Yamaguchi等^[28]基于前期提出的缺电子 π 共轭分子骨架的结构增强荧光团的光稳定性策略,在2019年开发了一种能够用于线粒体嵴实时动态超分辨成像的超稳定染料MitoPB Yellow。该探针由吸电子磷氧部分和供电子的二苯胺构成的具有分子内电荷转移的荧光团及靶向线粒体内膜的亲脂性阳离子三苯磷基团和高反应活性的环氧基组成[图3(a)]。探针在三苯基磷的正电荷驱动下靶向线粒体内膜,环氧基通过与内膜邻近蛋白发生共价反应,实现分子对线粒体的稳定标记,而脂质环境使得分子荧光开启,从而实现线粒体的稳定标记和稳定成像。该分子在STED下能够以<60 nm的分辨率可视化线粒体内膜结构,在活细胞下观察到线粒体嵴的形态[图3(b)]。由于荧光团的高稳定性,MitoPB Yellow可以对线粒体嵴的动态进行长时间

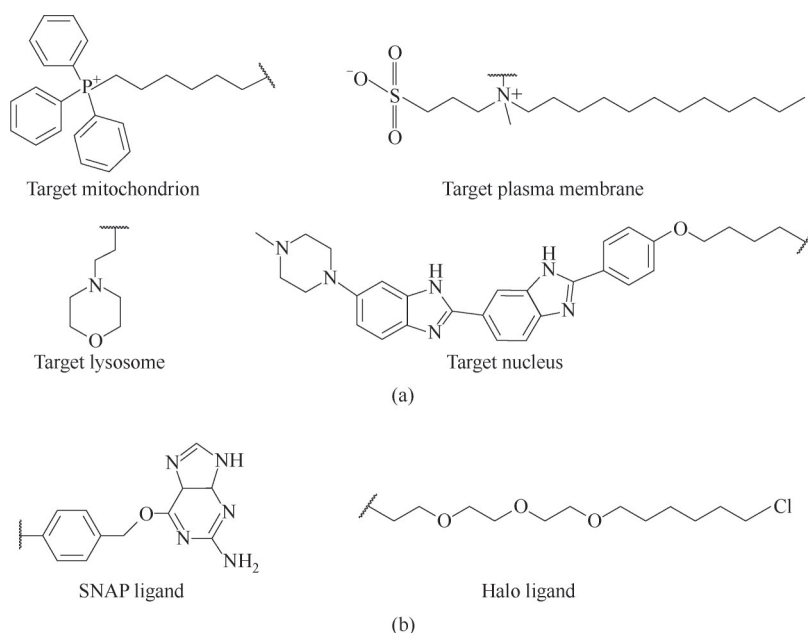
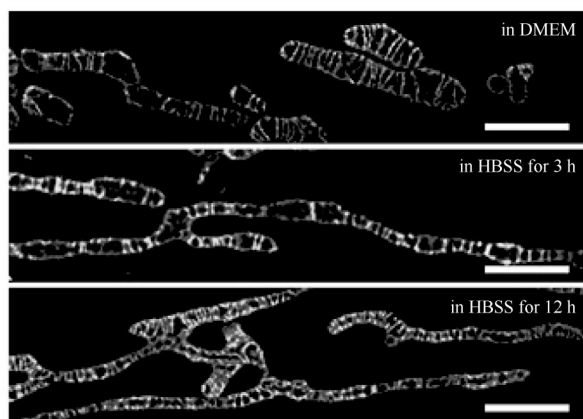
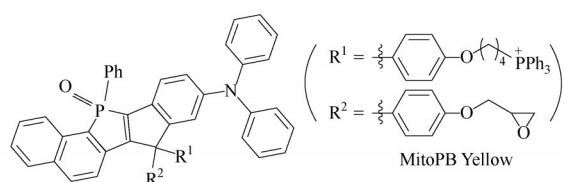
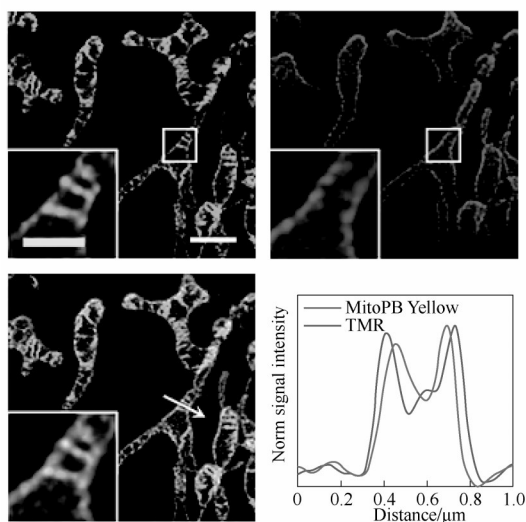


图2 常用细胞器的靶向基团(a)和常用蛋白标签(b)

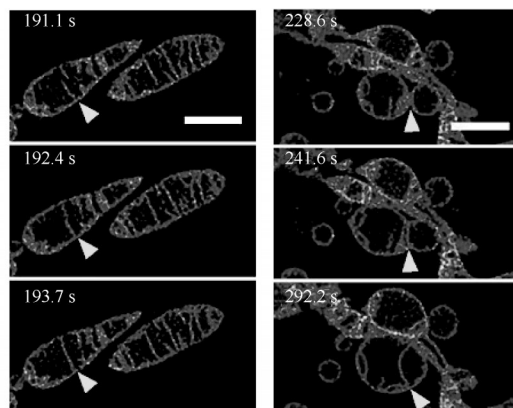
Fig.2 Ligand groups targeting mitochondria, plasma membrane, lysosomes, and nucleus (a); two universal protein tag ligands (b)



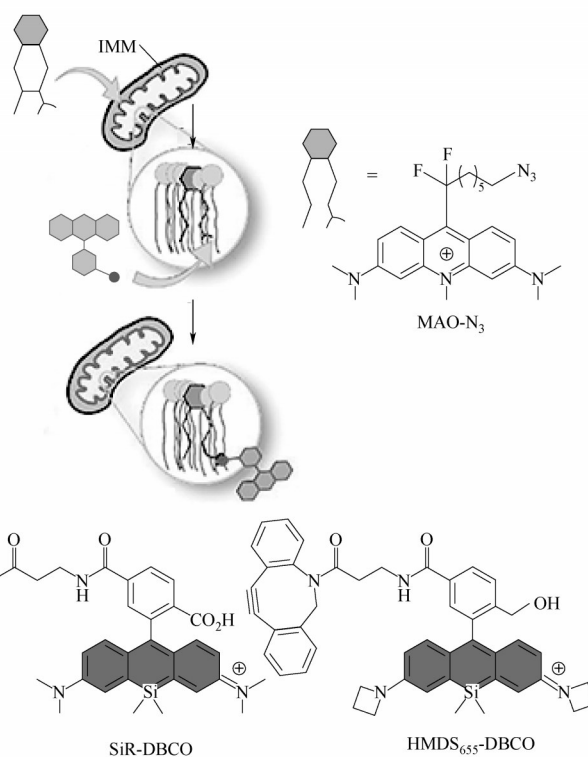
(a) molecular structure of MitoPB Yellow and STED imaging of mitochondrial cristae^[28]



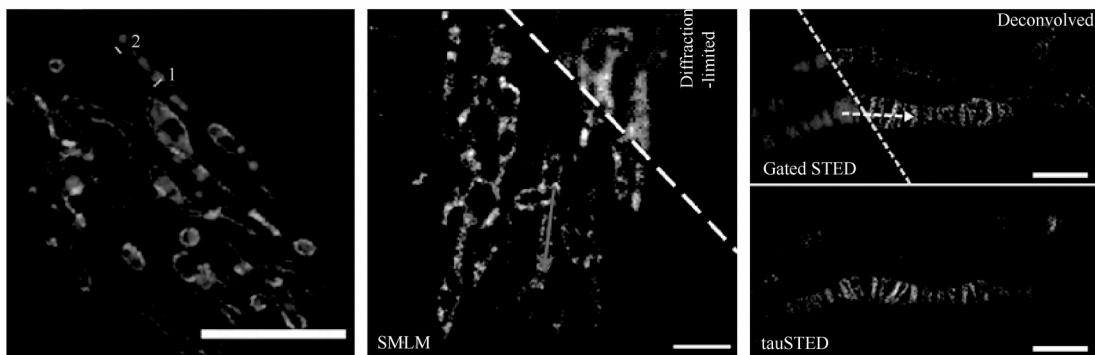
(b) two-color STED imaging of MitoPB Yellow and TMR



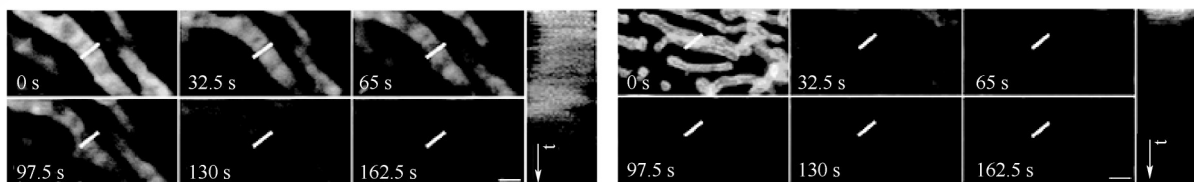
(c) dynamic super-resolution imaging of mitochondrial cristae



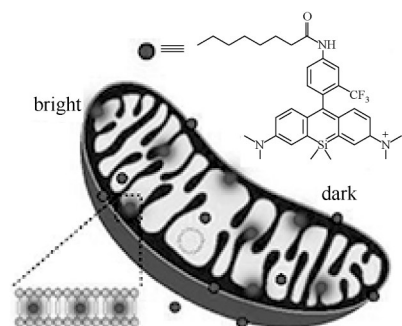
(d) the principle of HIDE probe^[29]



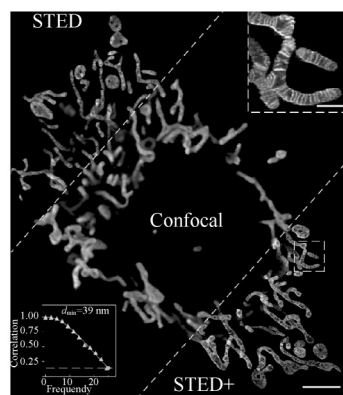
(e) two-color super-resolution imaging and dynamic super-resolution imaging using HIDE membrane probes



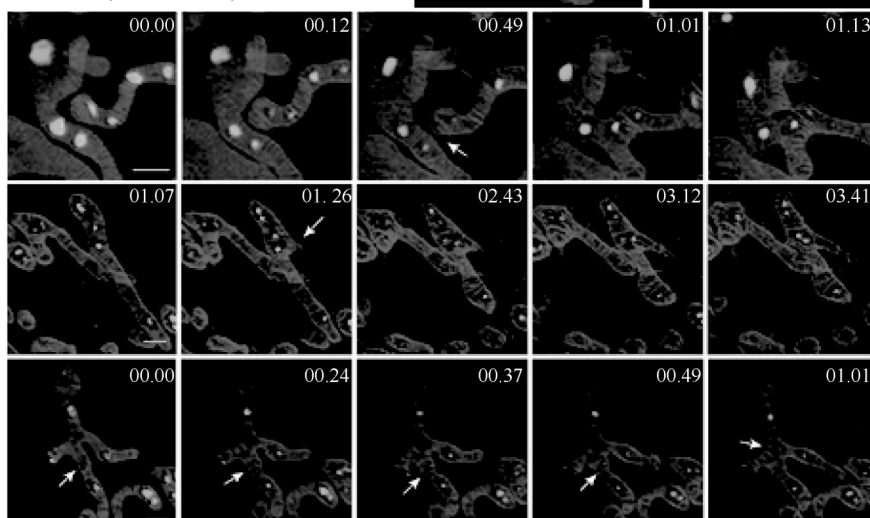
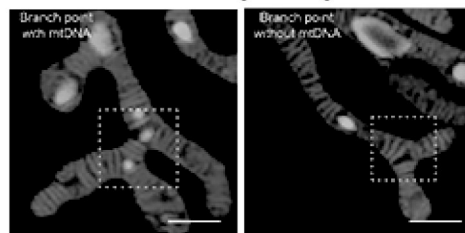
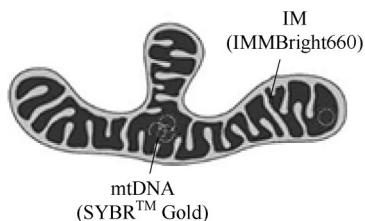
(f) two-color super-resolution imaging and dynamic super-resolution imaging using HIDE membrane probes



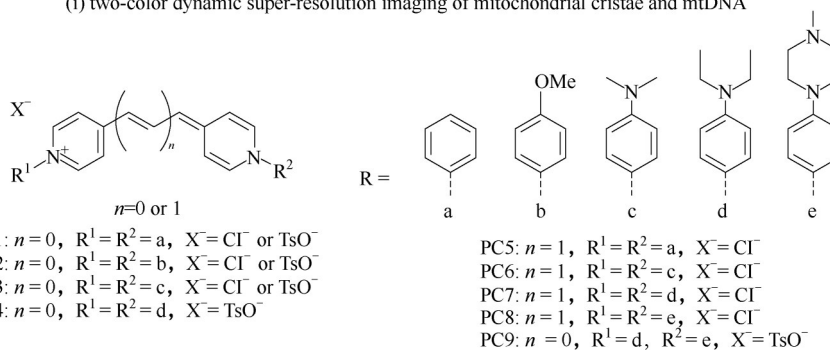
(g) the molecular structure of IMMBright660^[30]



(h) STED imaging of mitochondrial cristae using IMMBright660



(i) two-color dynamic super-resolution imaging of mitochondrial cristae and mtDNA



(j) the molecular structure of mtDNA dye^[31]

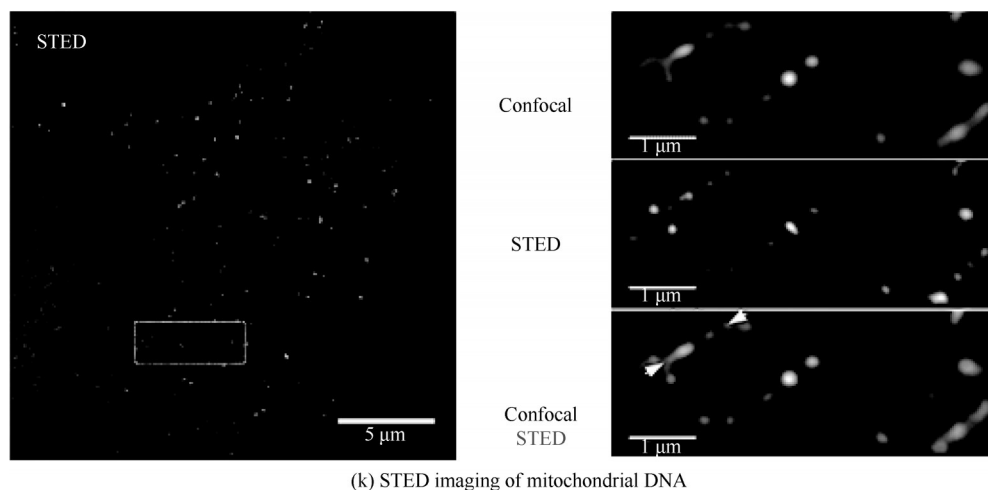


图3 基于正电荷靶向的线粒体超分辨荧光染料结构及其超分辨动态成像

Fig.3 Mitochondrial super-resolution fluorescent dye based on positive charge targeting and its dynamic super-resolution imaging

的跟踪,包括细胞凋亡样线粒体肿胀过程中不同线粒体的膜间融合以及单个线粒体的膜间融合等动态超微结构信息[图3(c)]。类似地,Schepartz等^[29]开发了一种可以靶向线粒体内膜的高密度、环境敏感性(HIDE)探针。该探针由两个模块构成,首先亲脂阳离子修饰反应性叠氮基团能够靶向线粒体,然后修饰炔基的硅罗丹明荧光团与叠氮反应,从而标记线粒体[图3(d)]。通过替换具有不同开关性质的硅罗丹明可以实现对线粒体长时间的SIM成像,SMLM成像以及STED成像[图3(e)、(f)]。此外,Xi等^[30]基于硅罗丹明染料也开发了长波长的线粒体染料IMMBright660。该染料引入三氟甲基以及脂溶性长碳链增强染料的光稳定性以及与线粒体结合的稳定性[图3(g)]。得益于IMMBright660的高亮度和稳定性,与能够可视化mtDNA的SYBR™ Gold联用实现线粒体嵴和mtDNA的双色STED超分辨成像,揭示了线粒体嵴与mtDNA的分布关系,以及多种动态过程[图3(h)、(i)]。但是SYBR™ Gold限制了对mtDNA的长时间STED成像。现有mtDNA标记的超分辨染料较少,除了SYBR类染料,Sato等^[31]在2021年开发的*N*-芳基吡啶菁衍生物[图3(j)]可以对细胞核以及mtDNA进行标记,并能够实现对mtDNA的STED超分辨成像[图3(k)]。

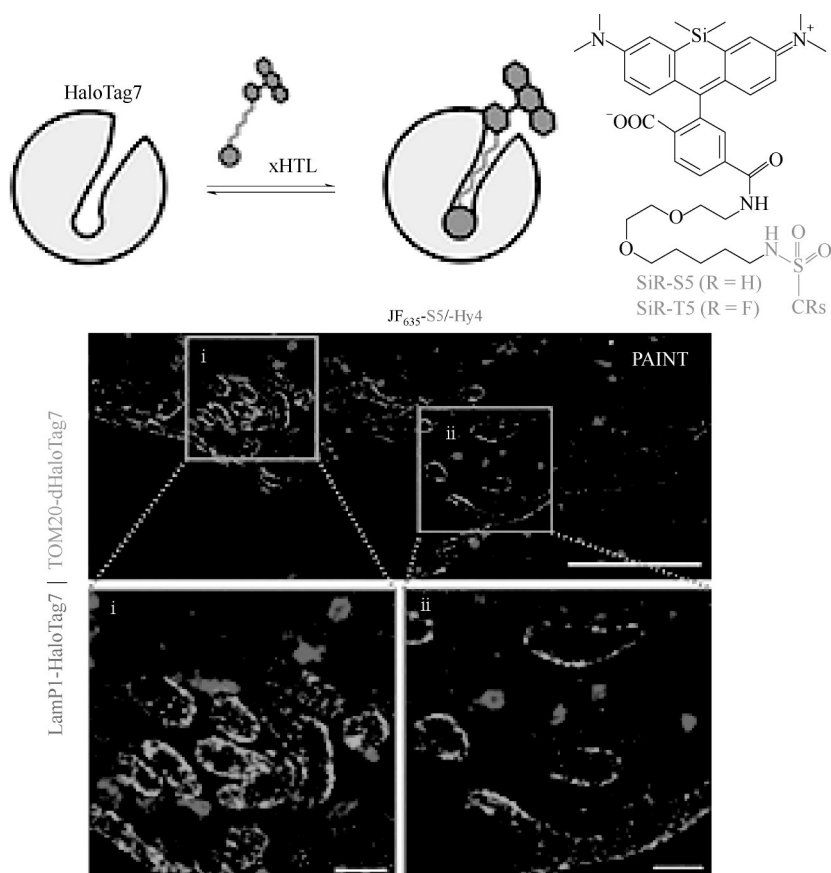
通过小分子染料的正电性可以对线粒体内膜及mtDNA选择性标记,但是线粒体外膜通常通过融合蛋白标签进行标记,利用光稳定和开关可调的罗丹明荧光团来实现对线粒体的多种超分辨成像。Johnsson等^[32]开发了可交换的halo配体[图4(a)],可以通过与Halo蛋白的可逆结合对目标进行标记。

由于可逆结合大幅度提高光稳定性,修饰上可逆Halo配体的罗丹明荧光团可以实现对线粒体外膜的STED成像[图4(b)],具有比共价连接的halo配体更长的成像时长。类似地,Piebler等^[33]也开发了能够可逆标记的方法,通过改造Halotags[图4(c)],利用修饰常规Halo配体的罗丹明,可以对线粒体外膜实现长时间的STED成像,以及对线粒体外膜蛋白的长时间超分辨单分子追踪[图4(d)]。

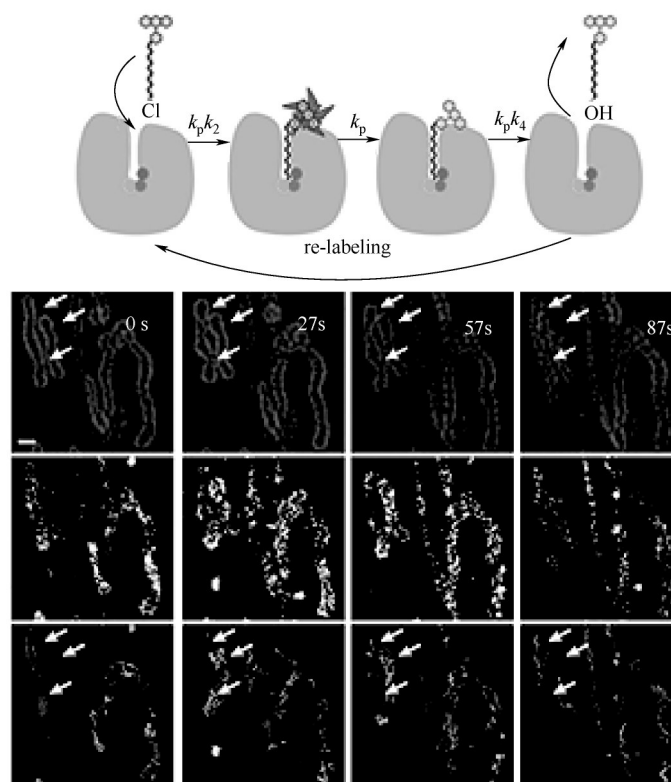
2.3 溶酶体超分辨成像荧光染料

溶酶体是100~500 nm的小型膜封闭的细胞质细胞器,内含许多水解酶,负责细胞内生物分子的降解,介导细胞代谢和细胞信号传导等功能。溶酶体的功能异常会导致引起多种疾病,因此开发能够实时可视化和跟踪溶酶体动态最终理解溶酶体工作原理的工具非常必要。超分辨率成像技术的快速发展,可以在纳米尺度下对单个溶酶体进行成像,基于此已经开发了多种溶酶体超分辨荧光探针^[11, 34-38]。

Zhang等^[39]在2014年发展了一种用于活细胞超分辨率成像的细胞渗透性有机荧光探针的一般策略。该策略通过引入具有不同细胞器靶向的细胞穿透肽,将其与罗丹明类荧光团进行共价连接,构成靶向不同细胞器的探针,包括特异性染色溶酶体探针。该探针是由靶向溶酶体的细胞穿透肽与具有能够光激活的光笼-Rho110组成,实现了溶酶体的PLAM成像,成像分辨率达到64 nm。为了实现溶酶体与线粒体长时间动态成像,2017年,Zhang等^[40]基于靶向溶酶体的细胞穿透肽,合成了高特异性、高稳定性的Lysosome-647、Lysosome-565、



(a) long-term PAINT imaging using reversible ligand labeling of mitochondria^[32]



(b) using the modified Halo protein to achieve reversible labeling of mitochondria for long-term super-resolution imaging and single-molecule tracking^[33]

图 4 利用改造的蛋白配体或者蛋白标签实现线粒体可逆标记进行长时间超分辨成像

Fig.4 Using modified Halo-ligands or Halotags to achieve reversible labeling of mitochondria for long-term super-resolution imaging

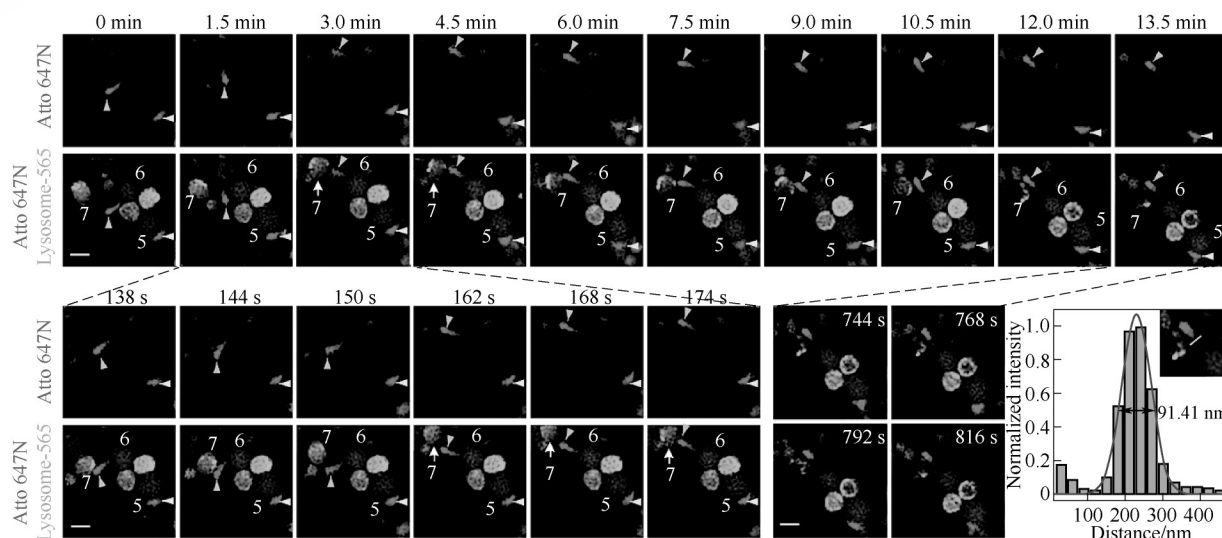


图5 基于细胞穿透肽靶向的溶酶体染料和商业线粒体染料的双色超分辨动态成像

Fig.5 Two-color super-resolution dynamic imaging of lysosomal and mitochondrial dyes by cell-penetrating peptide-targeted lysosomal dyes and commercial mitochondrial dyes^[40]

Lysosome-488,通过与AT647标记的线粒体联用,获得了活细胞中溶酶体线粒体在长时间(约90 nm)分辨率下动态物理相互作用的双色SIM成像,记录了溶酶体融合和裂变的连续动态过程,以及四种类型的溶酶体-线粒体相互作用(图5)。

特异性靶向配体和高性能荧光团的研制使溶酶体超分辨成像成为可能,但如何实现全细胞溶酶体的解析以及单个溶酶体物理化学信息的解析是更重大的挑战。Xu等^[41]开发了一种酸调节的自闪烁荧光探针,可以用于揭示全细胞溶酶体长时程动态(图6)。将邻甲基吡啶引入到罗丹明螺酰胺中,开发了自闪烁探针LysoSR-549。该探针的自闪烁参数 pK_{cycl} 约3.2,在pH 4.5~5时,少量染料处于开环形式,并且具有快速的开关环可逆平衡,使其能够在溶酶体pH下进行单分子定位实现超分辨成像,并达到了12 nm/20 ms的时空分辨率,具有目前所报道的溶酶体超分辨成像中最高的定位精度。同时由于溶酶体中具有足够的探针数量,且只有少数的探针处于闪烁发光的状态,这赋予了探针缓冲的能力来抵抗光漂白,保持优异的光稳定性,实现长时

间的超分辨成像,在单个溶酶体分辨的水平上解析全细胞所有溶酶体的运动轨迹。此外,通过探针单分子光子数与pH的关系,可以解析溶酶体的pH信息。

除了对溶酶体整体结构和动态的可视化,能用于溶酶体亚结构的染料也有报道。Yamaguchi等^[42]基于缺电子的磷氧化物骨架合成了能够特异性靶向溶酶体且标记于溶酶体膜的小分子染料LysoPB Yellow[图7(a)]。由于其优异的光稳定性和长的荧光寿命,能够在STED下实现溶酶体膜结构的超分辨成像,分辨率达到70 nm。而LysoPB Yellow在溶酶体膜上优异的保留能力和低的毒性,确保了在细胞自噬过程中溶酶体膜动态的长时超分辨成像。

此外,一些远红外溶酶体超分辨染料也逐渐被开发出来。Fan等^[34]开发了一种双条件精确控制的荧光开启可视化溶酶体的超分辨染料SiR-pHs。该分子由与溶酶体内部目标蛋白特异性结合配体以及具有pH响应的硅罗丹明构成。只有当探针与蛋白结合后解聚,然后在外界酸性条件存在下才有荧

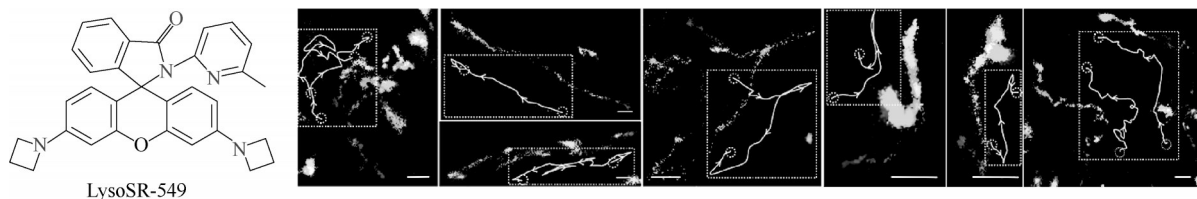
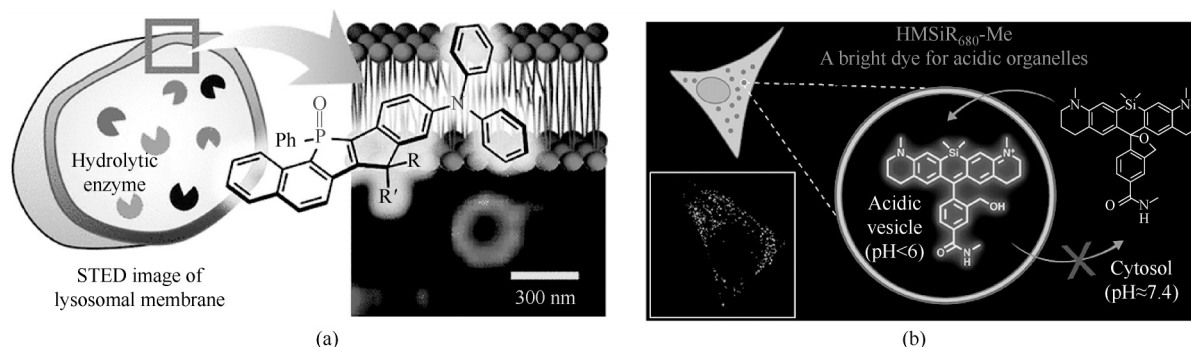


图6 LysoSR-549的结构及其用于溶酶体运动的动态追踪超分辨成像

Fig.6 The structure of LysoSR-549 and its use for dynamic tracking super-resolution imaging of lysosomal movement^[41]

图 7 超稳定的溶酶体超分辨染料^[42](a)和远红外的溶酶体超分辨染料^[43](b)Fig.7 Ultra-stable lysosomal super-resolution dyes^[42] (a) and far-infrared lysosomal super-resolution dyes^[43] (b)

光开启,因此可以用于溶酶体的高选择性超分辨成像。Schepartz 等^[43]在近期报道了一种明亮、光稳定、远红外的染料 HMSiR680-Me,可以实现多色、酸性细胞器的长时程超分辨率成像[图 7(b)]。

2.4 细胞膜超分辨成像荧光染料

细胞膜是一种高度异质的动态结构,由两性磷脂双分子层、胆固醇以及多种蛋白质和糖等功能分子组成。细胞膜具有控制物质的进出,免疫识别,保持细胞形态,以及电信号的传导等功能,为细胞的生命活动提供了相对稳定的内部环境。随着研究技术的提高,“脂筏模型”受到研究者的广泛关注。脂筏是由脂质-蛋白和脂质-脂质相互作用产生的不均匀、高度动态、富含胆固醇和鞘脂的有序纳米结构域,尺寸 10~200 nm。在细胞中,由于脂筏的高度动态性、纳米尺寸以及质膜突出和凹陷的柔性结构,使得脂筏的可视化是重大的挑战^[15,17]。为了研究细胞膜的超微结构,研究者开发了多种细胞膜超分辨荧光探针。

Schepartz 等^[44]报道了使用一系列 HIDE 探针,在亲脂膜环境中高密度定位膜渗透硅罗丹明染料 HMSiR,通过单分子闪烁可以实现长时间的超分辨率成像[图 8(a)]。膜靶向的 Dio 修饰反式环烯(TCO)与 HMSiR-tetrazine 通过生物正交反应实现了细胞膜的标记[图 8(b)]。在超分辨下,单个丝状足与相邻的丝状足相距 160 nm,并以低至 36 nm 的半高全宽(FWHM)分辨出来。此外,高分辨率的图像还可以可视化丝状足的动力学运动、生长和收缩[图 8(c)]。通过类似的策略,在 2017 年,该课题组进一步扩展了 HIDE 探针的用途,通过 STED 成像获得质膜的超长延时图像^[45]。HIDE 探针如 DiI-SiR 可以与培养的 HeLa 和原代海马神经元活细胞兼容。基于脂质不仅可以实现高密度的标记,而且脂质环境有

效地使大多数发色团处于暗态,形成“缓冲池”,保护它们免受光漂白[图 8(d)],这两者的结合获得了比最先进的融合蛋白更长动态成像和更高时间分辨率。使用 DiI-SiR,以 0.5 s 的时间分辨率在 25 min 内可视化 HeLa 细胞的丝状足动力学,并在 25 min 内以秒时间分辨率观察到小鼠原代海马神经元中 9 min 的动态接触介导的排斥事件[图 8(e)]。

除了细胞伪足的超分辨成像,最近,Contreras 等^[46]使用基于生物正交的胆固醇探针,超分辨成像揭示了在活细胞中纳米尺度脂质异质性[图 8(f)]。chol-N₃探针在没有干扰的情况下模拟合成膜和细胞膜中的胆固醇,证明在静息活细胞的质膜上存在 <50 nm 的富含胆固醇的纳米结构域。使用该工具,识别了这种亚扩散极限结构域的脂质膜结构,并且活细胞质膜中胆固醇的纳米级时空组织揭示了在不同空间位置胆固醇的多种扩散模式[图 8(g)]。

基于单分子定位的超分辨率荧光成像的时空分辨率很大程度上依赖于开关荧光染料。而在细胞膜超分辨成像中,膜探针的快速横向扩散严重阻碍了单分子定位。Klymchenko 等^[47]开发了一种基于明亮菁染料荧光二聚体(BTF)通过与细胞膜结合前后亮暗的开关变化实现了细胞膜的 PAINT 超分辨成像。基于前期开发的膜锚定单元,在低亲和力膜锚单元末端修饰与连接体连接的两个花菁单元构成探针。由于分子内染料 H 聚集荧光猝灭,与脂质膜可逆结合显示出发光。连接体中的带电基团进一步降低了探针对于脂质膜的亲和力,从而加速了其动态可逆的亮/暗切换[图 9(a)、(b)]。与 Nile Red 和 DiD 相比,BTF 具有更高的亮度,并且在细胞表面的扩散速度约为其的 1/10,将轴向定位精度提高了 3 倍以上,即降至 31 nm。该探针能够以 40 s 的时空分辨率对活细胞细胞膜上的纳米级纤维突起进行

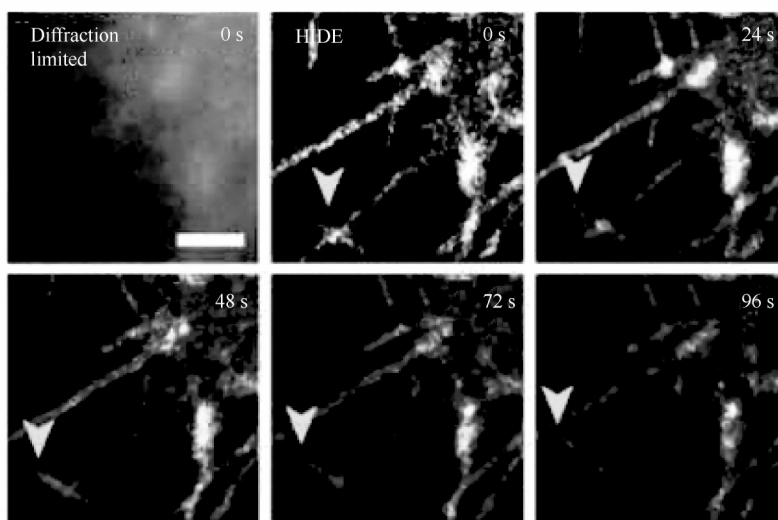
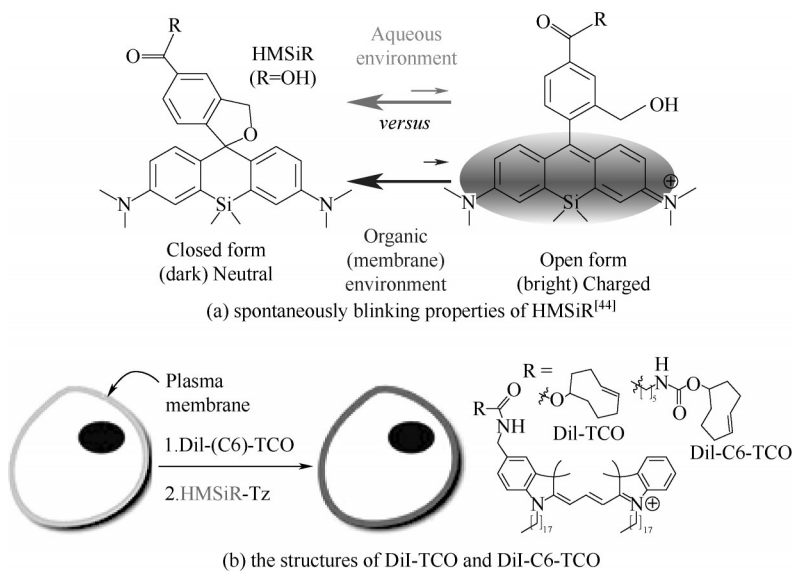
三维观察,揭示了它们的快速动态[图9(c)]。

细胞膜是一个高度动态的结构,通过超分辨可以解析细胞膜精细的结构信息,包括伪足的运动、胆固醇的时空分布、膜表面纳米级纤维等。但是,结构信息的解析不足以诠释其功能的全部。因此,需要对除结构以外物理化学参数比如极性、黏度、电荷、组分浓度等“功能”信息进行全面解析。Klymchenko等^[48-49]通过光谱分辨技术以及能够通过可逆结合开关变化的溶质变色染料实现了细胞膜的“功能”超分辨成像。基于Nile Red通过膜锚定基团的修饰,获得了能够与细胞膜可逆结合实现亮暗变化的NR4A,结合Nile Red母体自身的极性敏感性,不仅可以实现细胞膜的超微结构的可视化,还可以通过光谱分辨获取局部的极性信息从而判断

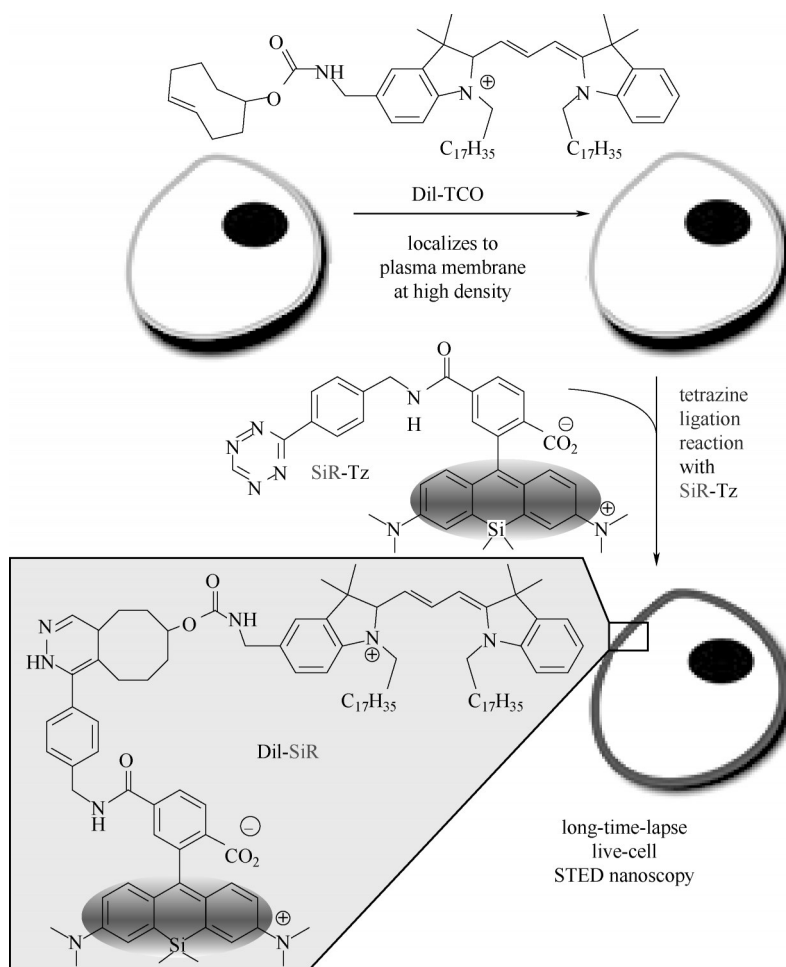
脂质的有序程度[图9(d)、(e)]。NR4A揭示了细胞表面脂质有序程度的异质性及纳米级膜拓扑结构与脂质组织的关系[图9(f)]。此外,2020年,Xu等^[50]通过单分子和超分辨率方法的协同作用,对活哺乳动物细胞中的膜形貌、扩散率和脂质堆积顺序进行纳米级精细映射。通过识别一种明亮的亲脂性荧光开启探针,该探针能够在频闪激发下对细胞膜进行持续的单分子成像,积累了 $>10^6$ 个探针分子的位置和瞬态位移,在超分辨率下描绘拓扑结构和扩散性的图谱。

2.5 脂滴超分辨成像荧光染料

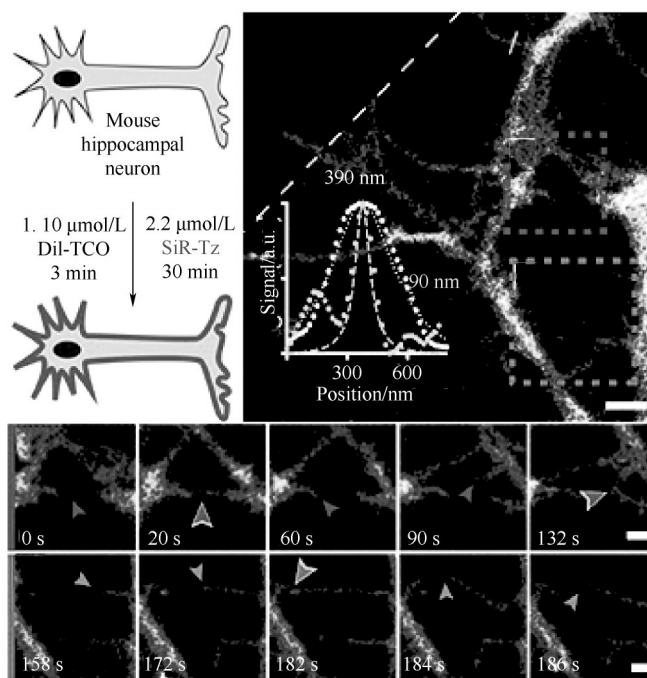
脂滴是由中性脂肪、甘油三酯、胆固醇和蛋白质包裹在磷脂双分子单层膜内,形成的球状或椭圆形细胞器。新生脂滴尺寸在30~60 nm,被认为是从



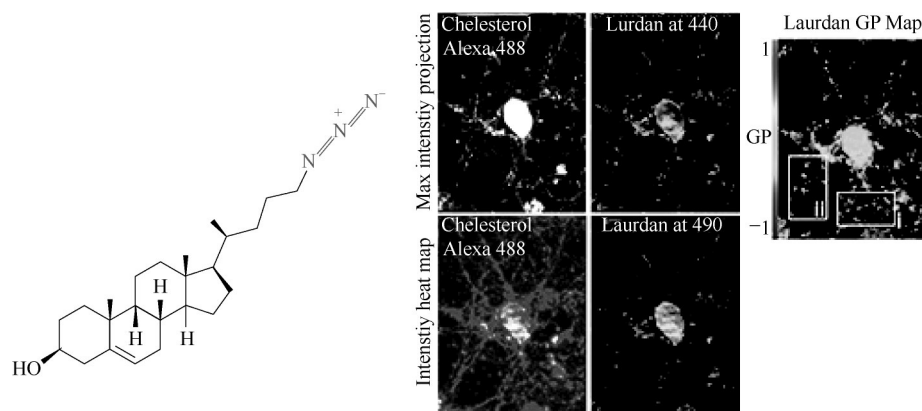
(c) time-lapse images of filopodial dynamics



(d) the procedure to label the plasma membrane with the HIDE probe^[45]



(e) long-term live-cell STED imaging of hippocampal neurons with Dil-SiR



(f) molecular structures of chol-N₃ (g) lipid nanodomains structure characterization in cells treated with chol-N₃^[46]

图8 细胞膜超分辨荧光染料结构及其超分辨动态成像

Fig.8 Cell membrane super-resolution fluorescent dyes and their super-resolution dynamic imaging

内质网膜释放到细胞质中,其成熟是通过与之前存在的脂滴融合或者自身在表面合成中性脂质。尽管脂滴的主要作用以前被认为是细胞中过量脂质的静态储存系统,但最近的研究表明,脂滴还调节各种表面膜蛋白的表达,并在控制细胞活动中发挥重要作用,如能量稳态、脂质代谢、膜转运以及抵抗病原体入侵等。这些功能的实现依赖于自身生成、成熟、分解以及与其他细胞器相互作用等动态过程。因此脂滴的荧光成像需要超高的空间分辨率以及揭示动态的时间分辨率。为了实现脂滴结构和动态的可视化,研究者开发了多种能用于脂滴超分辨成像的荧光探针^[14, 51-59]。

Yamaguchi 等^[60]基于噻吩梯型 π 共轭骨架 BTBT 中噻吩硫原子的氧化形成了强的推拉电子性质的荧光团 LAQ1[图 10(a)],具有超高的光稳定性。LAQ1 具有适当的亲脂性和环境敏感性,在油中具有较高的溶解度和高信噪比,可用于脂滴成像。由于其超高的光稳定性,可以利用 LAQ1 在 STED 显微镜下捕捉到内质网膜上的低于光学衍射极限的超小脂滴的生成以及通过 3D 成像实现长时间监测脂肪分解和脂肪生成过程中的脂滴动态[图 10(b)]。类似地, Lu 等^[61]构建了一系列具有耐受 STED 强激光的脂滴染料,该系列分子具有通过多个供受体基团形成的独特的中心对称分子结构。通过在均二苯乙烯分子骨架的中心苯环两侧双键和分子两端分别引入吸电子的氰基和供电子氨基获得具有高光稳定性、高亮度以及大斯托克斯位移的 Lipi-DSB。该分子具有极性敏感性,在弱极性溶剂中具有高量子产率,能对脂滴进行选择性荧光成像。利用 Lipi-DSB 以前所未有的超高分辨率 58 nm 实现了

细胞内脂滴 STED 超分辨成像,包括长时间的 STED 成像新生脂滴的融合,双色 STED 成像脂滴-线粒体动态作用,以及 3D STED 成像脂滴的空间分布[图 10(c)]。进一步,在 Lipi-DSB 基础上通过内嵌砷基吸电子基团来构建环结构得到 Lipi-BDTO,具有比 Lipi-DSB 更优异的 STED 损耗效率[图 10(d)]^[62]。为了全面揭示脂滴的多维信息,包括尺寸、极性、空间分布, Lu 等^[63]在 Lipi-DSB 上对称地引入两个甲氧基获得了具有环境更加敏感、高光稳定性、高亮度的多功能脂滴染料 Lipi-DSBOMe,实现了多种模式的成像[图 10(e)]。通过三维成像获得脂滴实时空间分布以及脂滴数量统计,lambda 扫描成像精确测量不同类似细胞的脂滴极性,STED 成像以 42 nm 的分辨率揭示脂滴尺寸。这样的单个探针的多模式成像同时获得生理、化学多方面的信息,全面解析脂滴的生理功能。

荧光探针的光稳定性对于超分辨的成像,特别是长时间的动态超分辨来说非常重要。除了分子结构的调控获得高稳定性的脂滴染料,通过独特的缓冲池策略是一种更精巧的设计思路。 Xu 等^[64]提出了“缓冲荧光探针”的策略解决脂滴动态成像中光不稳定的问题,构建了脂滴探针 LD-FG。LD-FG 具有合适的脂溶性,且在脂滴外极性环境中由于氢键作用,荧光猝灭。这些性质既能够保证足够的分子对脂滴染色,荧光增强,同时又有足够比例的分子在脂滴外处于暗态,形成缓冲池。缓冲池不仅可以快速补充脂滴中的光漂白探针,保证长时间成像的光稳定性,还可以及时对细胞中新生脂滴染色[图 11(a)]。得益于 LD-FG 优异的光稳定性,在 SIM 下对脂滴的多种动态过程进行了高时空分辨的成像,

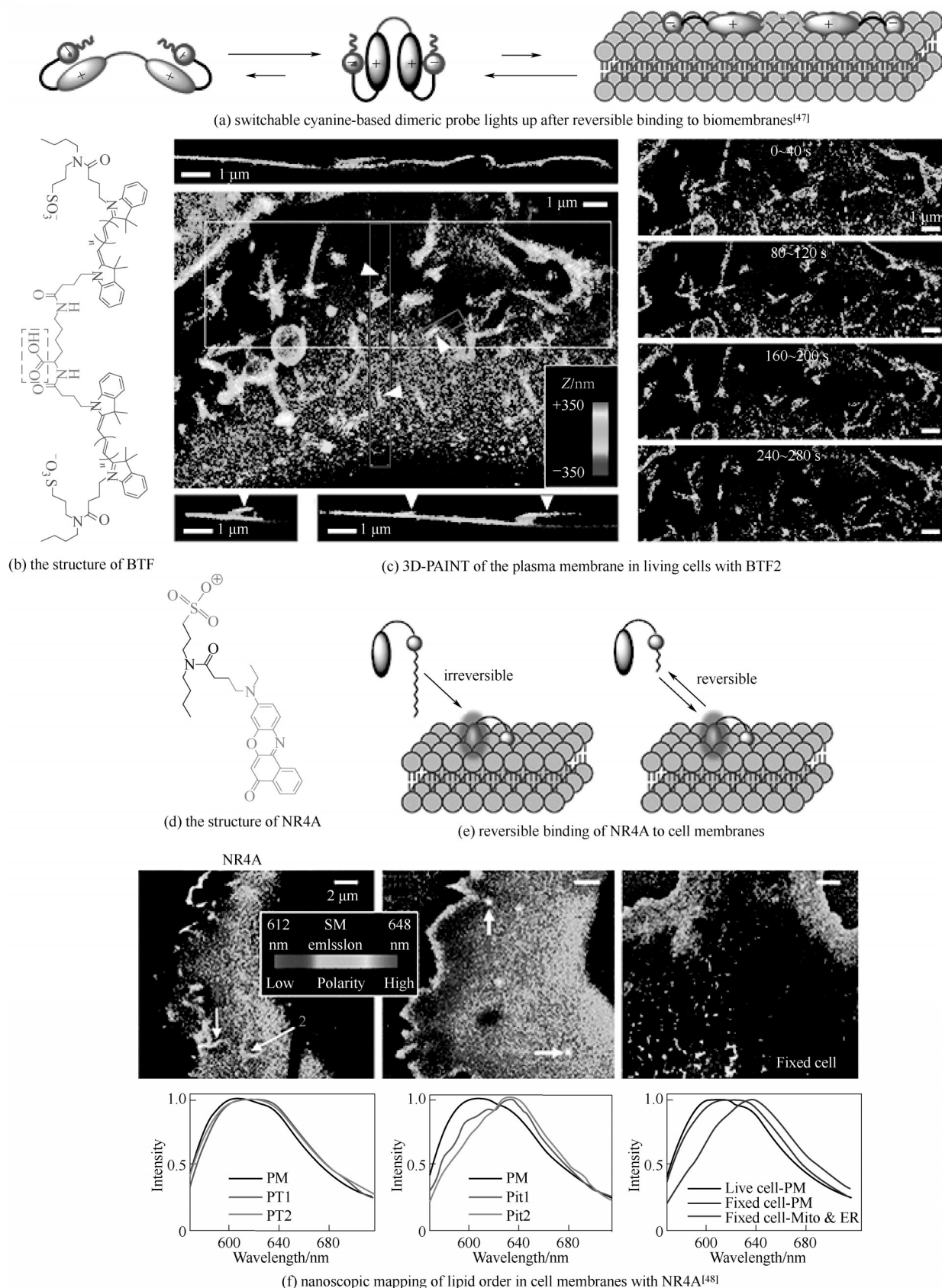
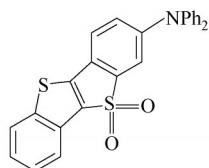
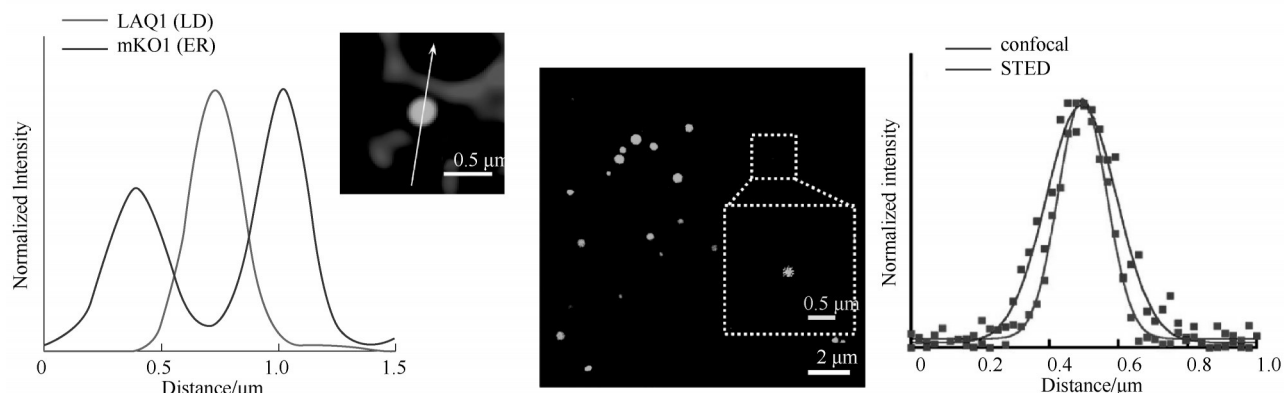


图9 细胞膜超分辨荧光染料结构及其3D超分辨动态成像和光谱分辨的超分辨成像

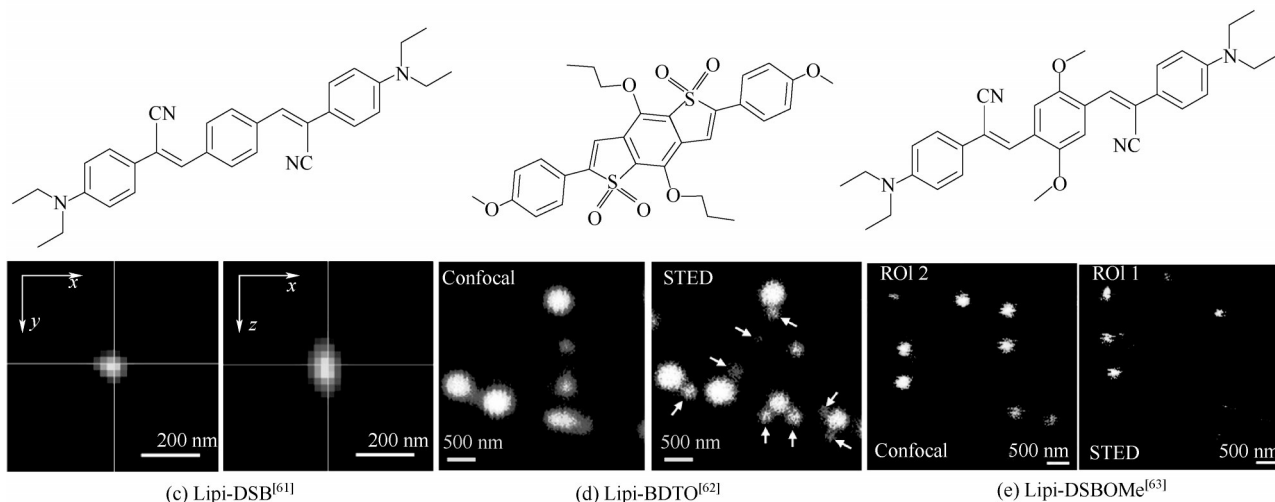
Fig.9 Cell membrane super-resolution fluorescent dyes for 3D super-resolution dynamic imaging and spectral-resolved super-resolution imaging



(a) molecular structure of LAQ1^[60]



(b) characterization of STED



(c) Lipi-DSB^[61]

(d) Lipi-BDTo^[62]

(e) Lipi-DSBOMe^[63]

图10 高光稳定性的脂滴超分辨染料

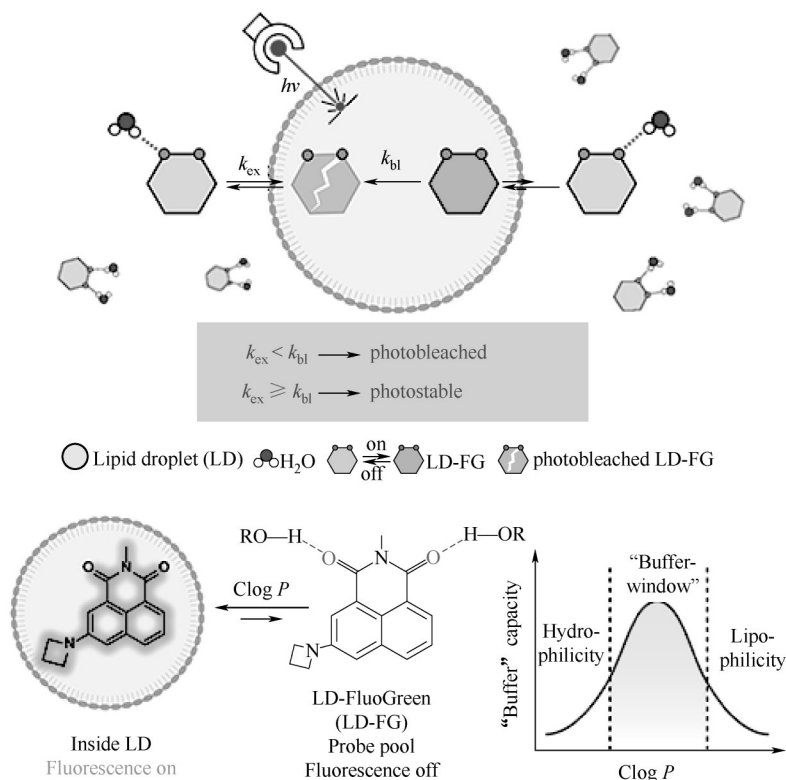
Fig.10 Highly photostable dyes for super-resolution imaging of lipid droplets

发现了两种新的脂滴融合模式,包括多个脂滴同时融合和线粒体介导的融合;揭示了细胞不同区域和不同细胞之间的脂滴异质性;提出了脂肪细胞分化过程中脂滴成熟的新模型[图 11(b)]。

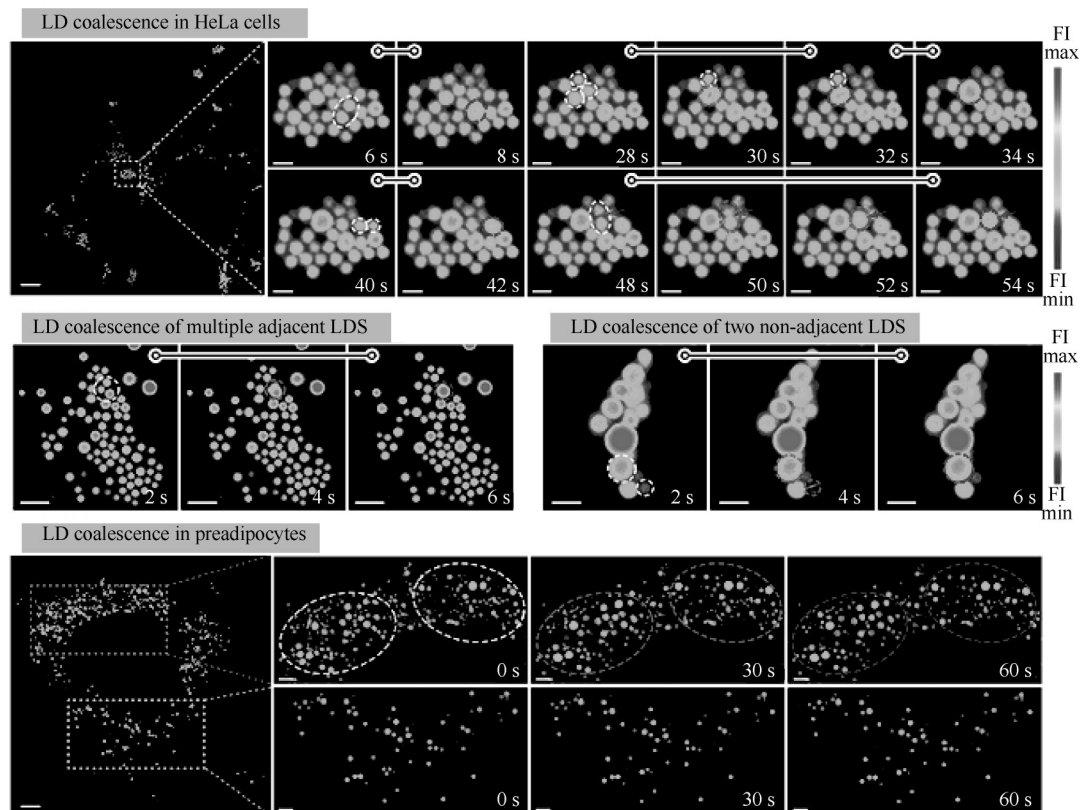
2.6 细胞核超分辨成像荧光染料

细胞核是真核细胞遗传与代谢的调控中心,主要由核膜、染色质、核仁、核基质等组成。随着超分辨技术的发展,具有悠久应用历史的 Hoechst 核染料难以与之兼容实现细胞核精细结构的可视化,得益于 Hoechst 优异的核靶向能力^[65],研究者开发了一系列适用于超分辨的染料。Tsukiji 等^[66]通过以 Hoechst 作为核染色质靶向配体与多种荧光团包括

荧光素、罗丹明、BODIPY 共价连接获得了新的具有覆盖多种波长范围的核染料[图 12(a)],这也为后续超分辨核染料的开发提供了基础。随后, Lukinavičius 等^[67]通过硅罗丹明与 Hoechst 的连接合成了 SiR-Hoechst[图 12(b)],这是第一个远红外核荧光染料,并且能够与活细胞 STED 成像兼容。此外, Xiao 等^[68]也合成了磺基罗丹明与 Hoechst 的偶联物 HoeSR[图 12(c)],能够用于 dSTORM 超分辨成像以探究细胞分裂过程中的染色体形态学。正是由于 Hoechst 作为核靶向配体的优异性能, Lukinavičius 等^[69]进一步揭示了这种罗丹明-Hoechst 的结构与成像性能之间的关系。研究发现 Hoechst



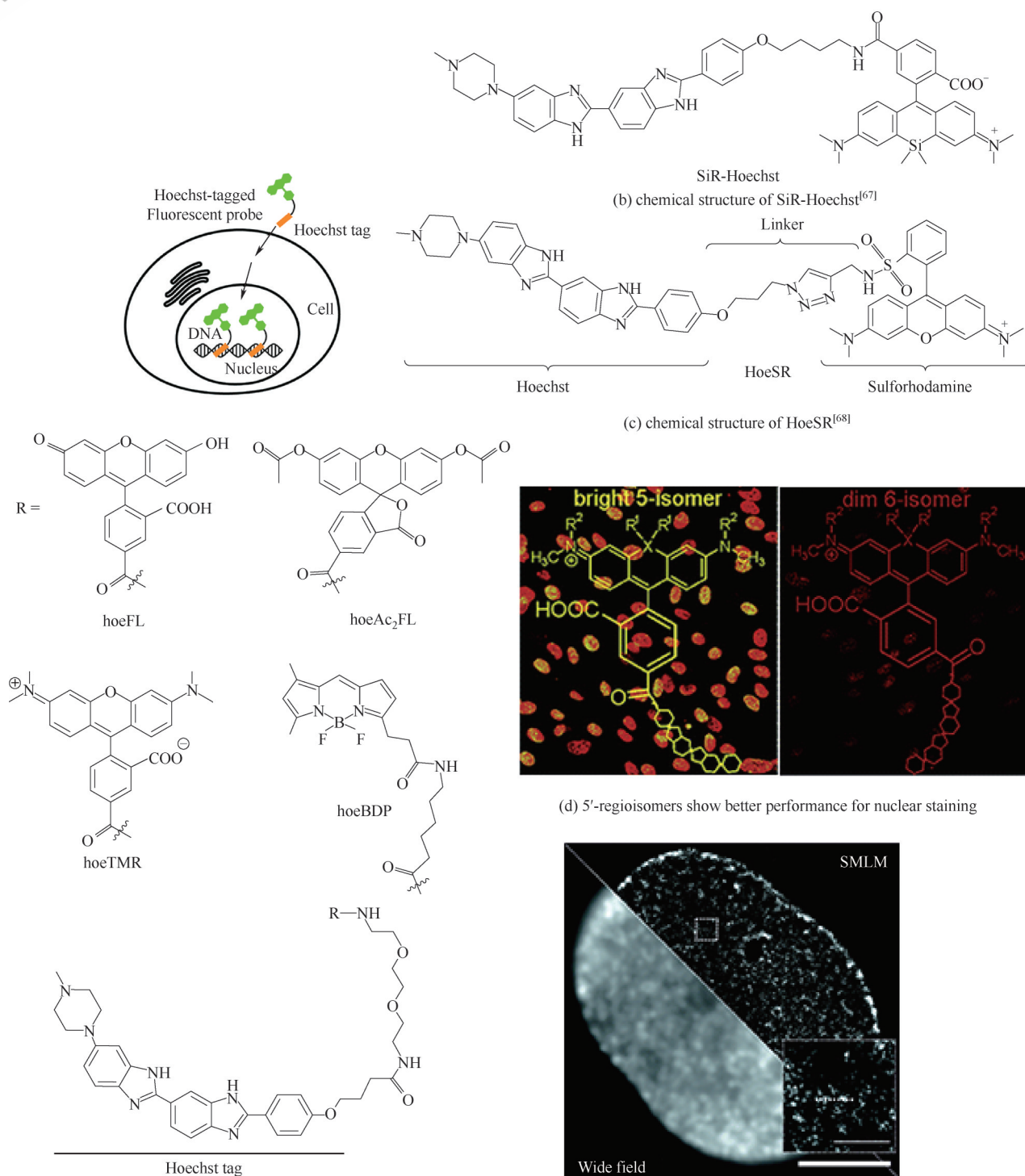
(a) mechanism of LD-FG for LD fluorogenic and dynamic imaging



(b) SIM image of LD coalescence in living cells^[64]

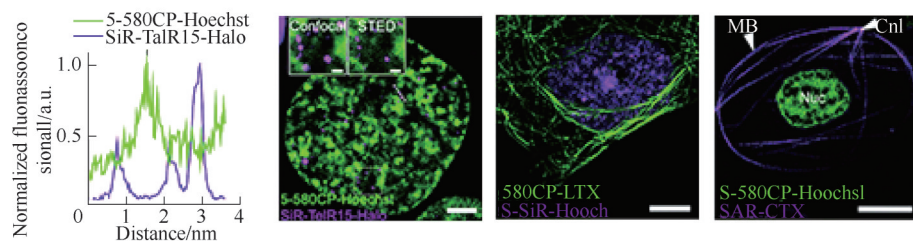
图 11 氢键敏感荧光探针通过缓冲策略对脂滴动态的超分辨稳定成像

Fig.11 Stable super-resolution imaging of lipid droplet (LD) dynamics via a buffering strategy using hydrogen-sensitive fluorescent probes



(a) nuclear dyes based on Hoechst covalently modified multiple fluorophore precursors^[66]

(g) super-resolution imaging of chromatin based on single molecules^[70]



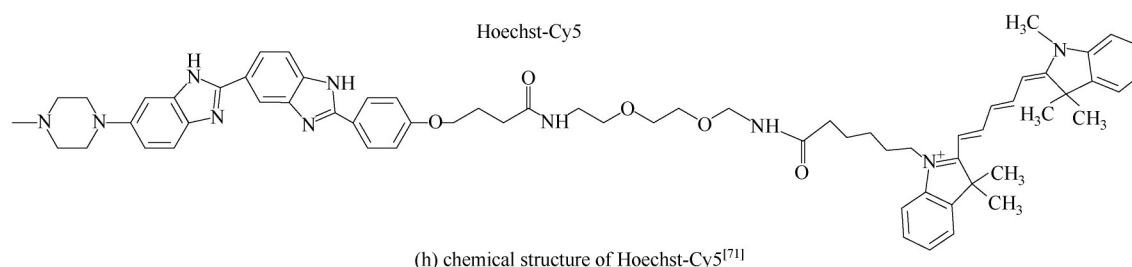
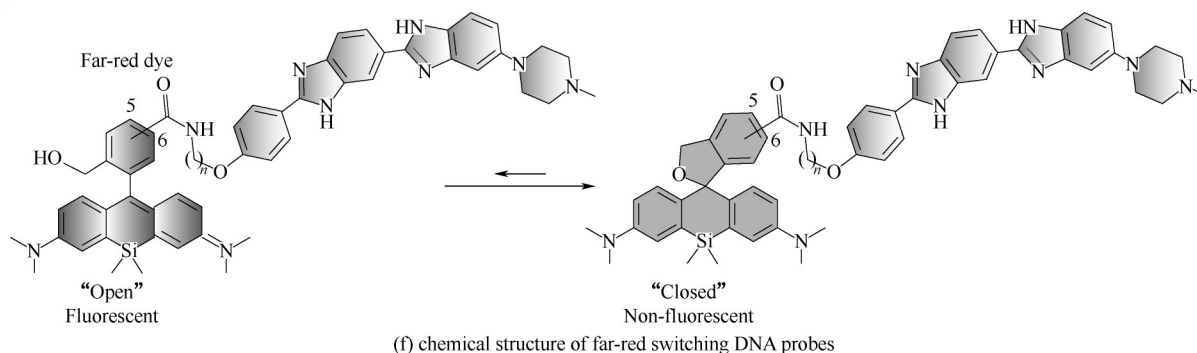


图12 以Hoechst为配体的细胞核超分辨成像染料

Fig.12 Hoechst-liganded dyes for super-resolution imaging of cell nuclei

与罗丹明底环不同位置的连接会显著影响最终分子的性能,所有测试6位连接染料都表现出与DNA的双模式结合,并在高DNA浓度下形成二聚物;5位连接的染料显示单模结合DNA,转化为增加亮度和降低细胞毒性[图12(d)]。通过这种规律优化得到了更高亮度的核染色效果,在STED下能够估计活细胞和完整鸡红细胞核孔区异染色质排斥区的直径为155 nm,并定位活U2OS细胞中端粒相对于异染色物质的位置[图12(e)]。基于这些工作,Lukinavičius等^[70]在2020年报道了基于单分子定位的核染色染料HMSiR[图12(f)],与DNA结合后具有400倍的荧光增强,实现了活细胞核DNA的免洗单分子超分辨成像以及3D STED成像[图12(g)]。除了罗丹明-Hoechst偶联荧光团,Liu等^[71]开发了cy5-Hoechst用于临床组织纳米级核结构的超分辨率成像[图12(h)]。

核仁作为细胞核中最大的细胞核亚结构,与核糖体的合成、组装、细胞周期的调控等密切相关。核仁目前被认为是由颗粒组分、纤维组分以及致密纤维组分三个区域组成。超分辨技术的发展也揭示了核仁新的结构,包括核仁环、致密纤维边缘等。由于缺乏核仁的靶向配体,基于小分子靶向的超分辨核仁染料还很少。Tian等^[72]在2022年发展了靶向核仁的金属配合物Mn-NCOI[图13(a)],能够对核仁RNA进行STED超分辨成像[图13(b)]。此外,通

过小分子-蛋白标签配体可以靶向核仁的三个区域,实现对核仁的超分辨成像。Xu等^[73]在2022年发展了动态聚集调控的SNAP-探针[图13(c)],能够对多种细胞器进行长时间动态成像,包括核仁的融合动态过程[图13(b)]。

3 总结与展望

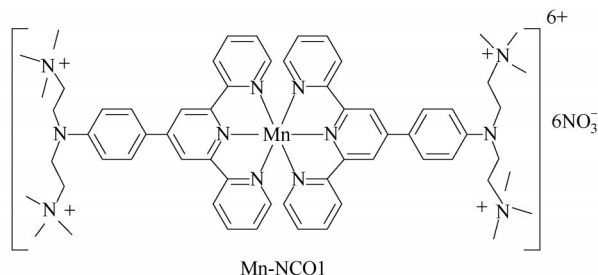
荧光染料在生物学领域的应用不断发展,从20世纪初的生物样本免疫染色,到20世纪末的生物荧光探针、荧光引导手术和光动力治疗等多个领域。这些进展使得荧光染料成为连接化学、生物学和医学的关键纽带之一。而随着21世纪初超分辨荧光成像技术的崛起和日益成熟,荧光染料的发展迎来了新的机遇和挑战。

未来荧光染料超分辨成像将不断追求更高的空间分辨率,以揭示更微小的细胞结构和分子细节。新一代荧光染料的研究将专注于提高成像分辨率,进一步拓展对生物学体系的认知。未来的发展也将倾向于整合多种成像模式,例如融合光学和声学成像,以在不同尺度和深度上实现全面的生物标本探测。这样的综合性成像方法将为科学家提供更全面的信息。发展荧光染料以适应活体成像是一个重要目标。新型染料需要表现出更好的穿透性和对生物环境的适应性,以实现在活体内部对

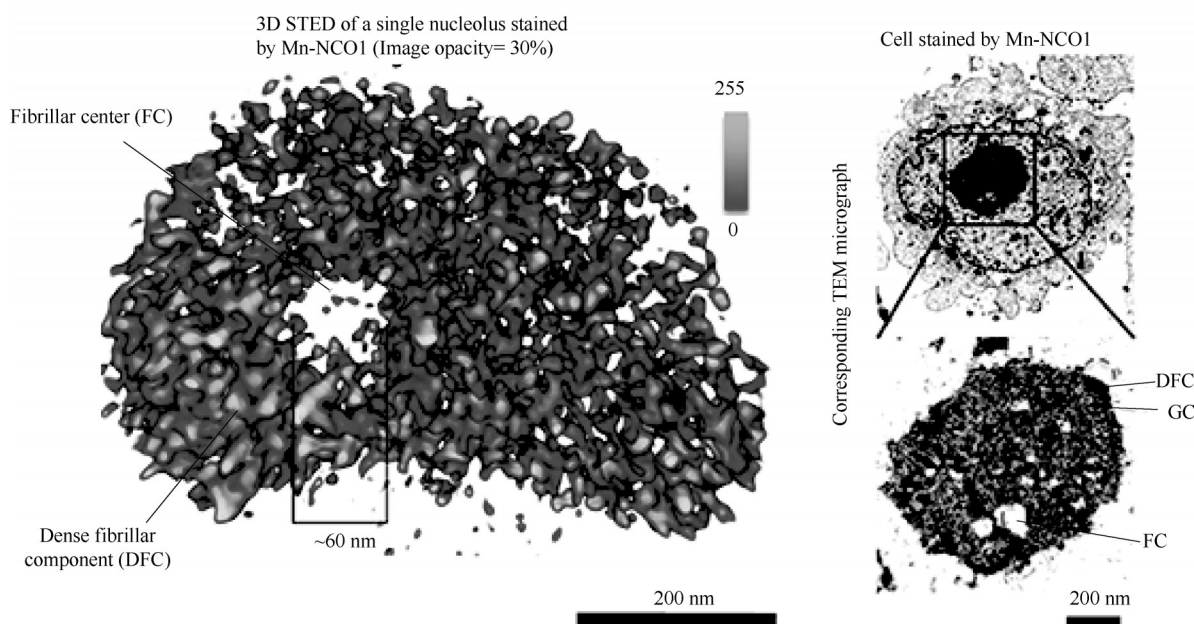
生物过程进行实时、非侵入式的观察。未来的荧光染料将致力于更广泛的生物标记物,覆盖蛋白质、核酸、细胞器等多个层面。这将促使研究者在不同层次上更全面地理解生物体系的运作机制。

提高荧光强度的同时维持光稳定性仍然是一项挑战。荧光染料需要在长时间成像过程中保持

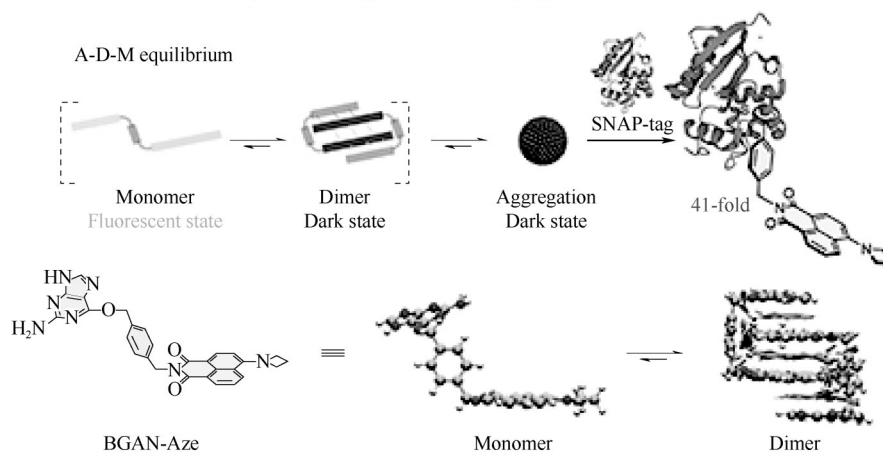
高强度的荧光信号,而不受光漂移和光演变的影响。染料的毒性和对生物相容性的影响是一个重要问题。为了在活体内进行研究,荧光染料需要具备足够的生物相容性,以防止对细胞和组织的不良影响。荧光染料需要在更广泛的波段上发光,以适应不同成像技术的要求。同时,需要克服某些波段



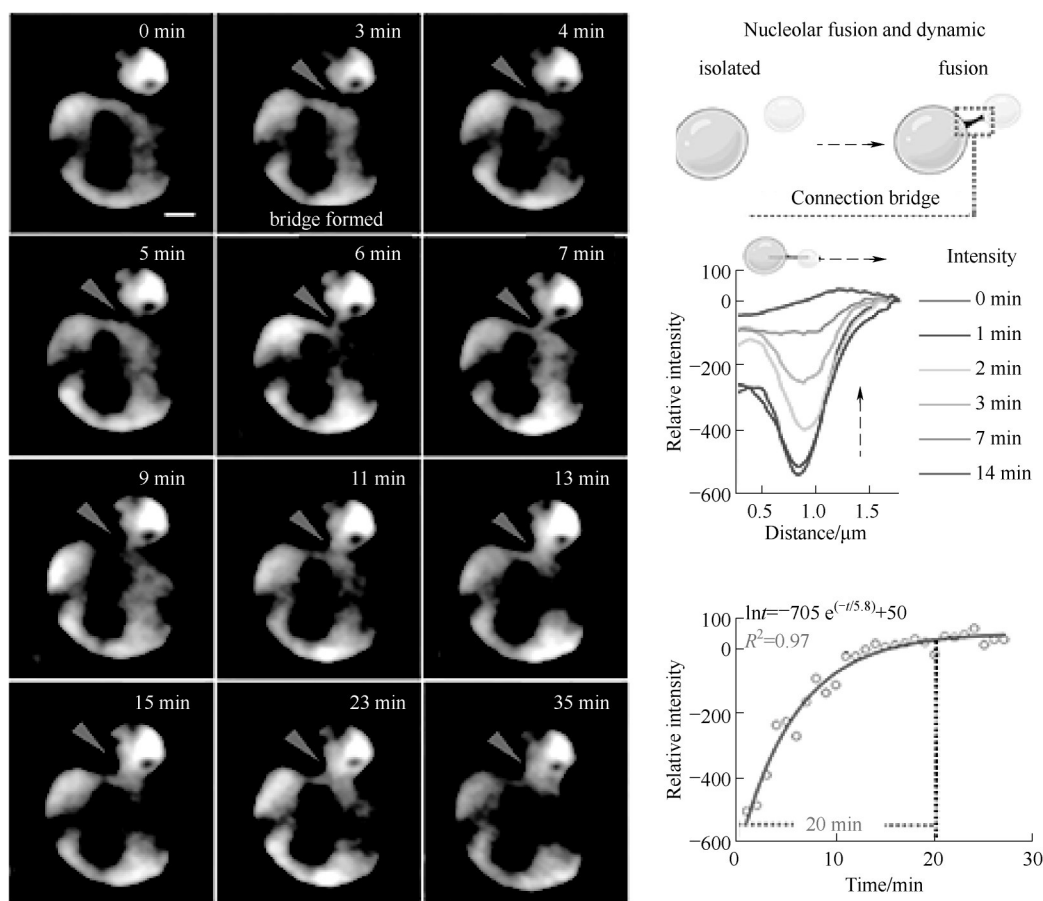
(a) molecular structure of Mn-NCO1



(b) ucleolus super-resolution imaging with Mn-NCO1^[72]



(c) the proposed A-D-M equilibrium fluorogenic SNAP-tag probe BGAN-Aze



(d) super-resolution imaging of nucleolar fusion in living HeLa cells^[73]

图13 用于核仁超分辨成像的有机小分子染料

Fig.13 Organic small molecule dyes for nucleolus super-resolution imaging

下的光散射和吸收问题。超分辨成像技术目前仍然面临着设备成本高、技术门槛高的问题。未来的发展需要更加注重技术的商业化和普及,以便更多研究者能够应用这一技术。在克服这些挑战的过程中,化学家和物理学家将继续密切合作,以创造出更先进、更可靠的荧光染料和超分辨成像技术,推动生物学和医学领域的研究取得新的突破。

参考文献

- [1] Jaswal S, Kumar J. Review on fluorescent donor-acceptor conjugated system as molecular probes[J]. Materials Today: Proceedings, 2020, **26**: 566-580.
- [2] Zeng S, Liu X S, Kafuti Y S, et al. Fluorescent dyes based on rhodamine derivatives for bioimaging and therapeutics: recent progress, challenges, and prospects[J]. Chemical Society Reviews, 2023, **52**(16): 5607-5651.
- [3] Alander J T, Kaartinen I, Laakso A, et al. A review of indocyanine green fluorescent imaging in surgery[J]. International Journal of Biomedical Imaging, 2012, **2012**: 940585.
- [4] Fu Q F, Shen S Y, Sun P W, et al. Bioorthogonal chemistry for prodrug activation *in vivo*[J]. Chemical Society Reviews, 2023, **52**

(22): 7737-7772.

- [5] Scinto S L, Bilodeau D A, Hincapie R, et al. Bioorthogonal chemistry[J]. Nature Reviews Methods Primers, 2021, **1**: 30.
- [6] Lardon N, Wang L, Tschanz A, et al. Systematic tuning of rhodamine spirocyclization for super-resolution microscopy[J]. Journal of the American Chemical Society, 2021, **143**(36): 14592-14600.
- [7] Sunbul M, Lackner J, Martin A, et al. Super-resolution RNA imaging using a rhodamine-binding aptamer with fast exchange kinetics[J]. Nature Biotechnology, 2021, **39**: 686-690.
- [8] Liu X G, Qiao Q L, Tian W M, et al. Aziridinyl fluorophores demonstrate bright fluorescence and superior photostability by effectively inhibiting twisted intramolecular charge transfer[J]. Journal of the American Chemical Society, 2016, **138**(22): 6960-6963.
- [9] Wang C, Chi W J, Qiao Q L, et al. Twisted intramolecular charge transfer (TICT) and twists beyond TICT: from mechanisms to rational designs of bright and sensitive fluorophores[J]. Chemical Society Reviews, 2021, **50**(22): 12656-12678.
- [10] Wang C, Qiao Q L, Chi W J, et al. Quantitative design of bright fluorophores and AIEgens by the accurate prediction of twisted intramolecular charge transfer (TICT) [J]. Angewandte Chemie International Edition, 2020, **59**(25): 10160-10172.
- [11] Yadav A, Rao C, Nandi C K. Fluorescent probes for super-

- resolution microscopy of lysosomes[J]. ACS Omega, 2020, **5**(42): 26967–26977.
- [12] Jakobs S, Stephan T, Ilgen P, et al. Light microscopy of mitochondria at the nanoscale[J]. Annual Review of Biophysics, 2020, **49**: 289–308.
- [13] Samanta S, He Y, Sharma A, et al. Fluorescent probes for nanoscopic imaging of mitochondria[J]. Chem, 2019, **5**(7): 1697–1726.
- [14] Zhao Y Y, Shi W, Li X H, et al. Recent advances in fluorescent probes for lipid droplets[J]. Chemical Communications, 2022, **58** (10): 1495–1509.
- [15] Stone M B, Shelby S A, Veatch S L. Super-resolution microscopy: shedding light on the cellular plasma membrane[J]. Chemical Reviews, 2017, **117**(11): 7457–7477.
- [16] Gao P, Pan W, Li N, et al. Fluorescent probes for organelle-targeted bioactive species imaging[J]. Chemical Science, 2019, **10** (24): 6035–6071.
- [17] Dadina N, Tyson J, Zheng S, et al. Imaging organelle membranes in live cells at the nanoscale with lipid-based fluorescent probes [J]. Current Opinion in Chemical Biology, 2021, **65**: 154–162.
- [18] Han R C, Li Z H, Fan Y Y, et al. Recent advances in super-resolution fluorescence imaging and its applications in biology[J]. Journal of Genetics and Genomics, 2013, **40**(12): 583–595.
- [19] Duan X X, Zhang M, Zhang Y H. Organic fluorescent probes for live-cell super-resolution imaging[J]. Frontiers of Optoelectronics, 2023, **16**(1): 34.
- [20] Nollmann M, Georgieva M. Superresolution microscopy for bioimaging at the nanoscale: from concepts to applications in the nucleus[J]. Research and Reports in Biology, 2015, **2015**(6): 157.
- [21] Chung K K H, Zhang Z, Kidd P, et al. Fluorogenic DNA-PAINT for faster, low-background super-resolution imaging[J]. Nature Methods, 2022, **19**: 554–559.
- [22] Zhai R X, Fang B, Lai Y Q, et al. Small-molecule fluorogenic probes for mitochondrial nanoscale imaging[J]. Chemical Society Reviews, 2023, **52**(3): 942–972.
- [23] Fang H B, Chen Y C, Geng S S, et al. Super-resolution imaging of mitochondrial HClO during cell ferroptosis using a near-infrared fluorescent probe[J]. Analytical Chemistry, 2022, **94**(51): 17904–17912.
- [24] Li W, Pan W H, Huang M N, et al. Disulfide-reduction-triggered spontaneous photoblinking Cy5 probe for nanoscopic imaging of mitochondrial dynamics in live cells[J]. Analytical Chemistry, 2021, **93**(4): 2596–2602.
- [25] Wang H W, Fang B, Peng B, et al. Recent advances in chemical biology of mitochondria targeting[J]. Frontiers in Chemistry, 2021, **9**: 683220.
- [26] Yang Z G, Xiong J, Zhang W, et al. A reversibly intramolecular cyclization Cy5 optical probe for stochastic optical reconstruction microscopy in live cell mitochondria[J]. Acta Chimica Sinica, 2020, **78**(2): 130.
- [27] Zhang J, Samanta S, Wang J L, et al. Study on a novel probe for stimulated emission depletion super-resolution imaging of mitochondria[J]. Acta Physica Sinica, 2020, **69**(16): 168702.
- [28] Wang C G, Taki M, Sato Y, et al. A photostable fluorescent marker for the superresolution live imaging of the dynamic structure of the mitochondrial cristae[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2019, **116**(32): 15817–15822.
- [29] Zheng S, Dadina N, Mozumdar D, et al. Long-term super-resolution inner mitochondrial membrane imaging with a lipid probe[J]. Nature Chemical Biology, 2024, **20**: 83–92.
- [30] Ren W, Ge X C, Li M Q, et al. Visualization of mitochondrial cristae and mtDNA evolvment and interactions with super-resolution microscopy[J]. bioRxiv, 2022. DOI: 10.1101/2022.12.26.521907.
- [31] Yang X S, Yang Z G, Wu Z Y, et al. Mitochondrial dynamics quantitatively revealed by STED nanoscopy with an enhanced squaraine variant probe[J]. Nature Communications, 2020, **11**: 3699.
- [32] Kompa J, Bruins J, Glogger M, et al. Exchangeable HaloTag ligands for super-resolution fluorescence microscopy[J]. Journal of the American Chemical Society, 2023, **145**(5): 3075–3083.
- [33] Holtmannspötter M, Wienbecker E, Dellmann T, et al. Reversible live-cell labeling with retro-engineered HaloTags enables long-term high- and super-resolution imaging[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2023, **62**(18): e202219050.
- [34] Fan M T, An H Y, Wang C F, et al. STED imaging the dynamics of lysosomes by dually fluorogenic Si-rhodamine[J]. Chemistry, 2021, **27**(37): 9620–9626.
- [35] Liu L Y, Fang H B, Chen Q X, et al. Multiple-color platinum complex with super-large stokes shift for super-resolution imaging of autolysosome escape[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2020, **59**(43): 19229–19236.
- [36] Lv Z, Man Z W, Cui H T, et al. Red AIE luminogens with tunable organelle specific anchoring for live cell dynamic super resolution imaging[J]. Advanced Functional Materials, 2021, **31**(10): 2009329.
- [37] Wang H, Fang G Q, Chen H M, et al. Lysosome-targeted biosensor for the super-resolution imaging of lysosome-mitochondrion interaction[J]. Frontiers in Pharmacology, 2022, **13**: 865173.
- [38] Ye Z W, Zheng Y, Peng X J, et al. Surpassing the background barrier for multidimensional single-molecule localization super-resolution imaging: a case of lysosome-exclusively turn-on probe [J]. Analytical Chemistry, 2022, **94**(22): 7990–7995.
- [39] Pan D, Hu Z, Qiu F W, et al. A general strategy for developing cell-permeable photo-modulatable organic fluorescent probes for live-cell super-resolution imaging[J]. Nature Communications, 2014, **5**: 5573.
- [40] Han Y B, Li M H, Qiu F W, et al. Cell-permeable organic fluorescent probes for live-cell long-term super-resolution imaging reveal lysosome-mitochondrion interactions[J]. Nature Communications, 2017, **8**: 1307.
- [41] Qiao Q L, Liu W J, Chen J, et al. An acid-regulated self-blinking fluorescent probe for resolving whole-cell lysosomes with long-term nanoscopy[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2022, **61**(21): e202202961.
- [42] Wang C G, Taki M, Kajiura K, et al. Phosphole-oxide-based fluorescent probe for super-resolution stimulated emission depletion live imaging of the lysosome membrane[J]. ACS Materials Letters, 2020, **2**(7): 705–711.
- [43] Lesiak L, Dadina N, Zheng S, et al. A bright, photostable, and far-red dye that enables multicolor, time-lapse, and super-resolution imaging of acidic organelles[J]. ACS Central Science, 2023, **10**(1):

- 19–27.
- [44] Takakura H, Zhang Y D, Erdmann R S, et al. Long time-lapse nanoscopy with spontaneously blinking membrane probes[J]. *Nature Biotechnology*, 2017, **35**: 773–780.
- [45] Thompson A D, Omar M H, Rivera-Molina F, et al. Long-term live-cell STED nanoscopy of primary and cultured cells with the plasma membrane HIDE probe DiI-SiR[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2017, **56**(35): 10408–10412.
- [46] Lorizate M, Terrones O, Nieto-Garai J A, et al. Super-resolution microscopy using a bioorthogonal-based cholesterol probe provides unprecedented capabilities for imaging nanoscale lipid heterogeneity in living cells[J]. *Small Methods*, 2021, **5**(9): e2100430.
- [47] Aparin I O, Yan R, Pelletier R, et al. Fluorogenic dimers as bright switchable probes for enhanced super-resolution imaging of cell membranes[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2022, **144**(39): 18043–18053.
- [48] Danylchuk D I, Moon S, Xu K, et al. Switchable solvatochromic probes for live-cell super-resolution imaging of plasma membrane organization[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2019, **58**(42): 14920–14924.
- [49] Moon S, Yan R, Kenny S J, et al. Spectrally resolved, functional super-resolution microscopy reveals nanoscale compositional heterogeneity in live-cell membranes[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2017, **139**(32): 10944–10947.
- [50] Yan R, Chen K, Xu K. Probing nanoscale diffusional heterogeneities in cellular membranes through multidimensional single-molecule and super-resolution microscopy[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2020, **142**(44): 18866–18873.
- [51] Cao M Y, Zhu T, Zhao M Y, et al. Structure rigidification promoted ultrabright solvatochromic fluorescent probes for super-resolution imaging of cytosolic and nuclear lipid droplets[J]. *Analytical Chemistry*, 2022, **94**(30): 10676–10684.
- [52] Liu G N, Zheng H L, Zhou R, et al. Ultrabright organic fluorescent probe for quantifying the dynamics of cytosolic/nuclear lipid droplets[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2023, **241**: 115707.
- [53] Connor D O, Byrne A, Berselli G B, et al. Mega-stokes pyrene ceramide conjugates for STED imaging of lipid droplets in live cells[J]. *The Analyst*, 2019, **144**(5): 1608–1621.
- [54] Wu M Y, Leung J K, Kam C, et al. A near-infrared AIE probe for super-resolution imaging and nuclear lipid droplet dynamic study [J]. *Materials Chemistry Frontiers*, 2021, **5**(7): 3043–3049.
- [55] Xu H K, Zhang H H, Liu G, et al. Coumarin-based fluorescent probes for super-resolution and dynamic tracking of lipid droplets [J]. *Analytical Chemistry*, 2019, **91**(1): 977–982.
- [56] Zhang C Y, Shao H R, Zhang J, et al. Long-term live-cell lipid droplet-targeted biosensor development for nanoscopic tracking of lipid droplet-mitochondria contact sites[J]. *Theranostics*, 2021, **11** (16): 7767–7778.
- [57] Zheng X J, Zhu W C, Ni F, et al. Simultaneous dual-colour tracking lipid droplets and lysosomes dynamics using a fluorescent probe[J]. *Chemical Science*, 2018, **10**(8): 2342–2348.
- [58] Zheng X J, Zhu W C, Ni F, et al. A specific bioprobe for super-resolution fluorescence imaging of lipid droplets[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2018, **255**: 3148–3154.
- [59] 周日, 王晨光, 卢革宇. 用于细胞脂滴超分辨荧光成像的有机荧光探针研究进展[J]. *中国光学*, 2022, **15**(6): 1228–1242.
- Zhou R, Wang C G, Lu G Y. Advances in organic fluorescent probes for super-resolution imaging of cellular lipid droplets[J]. *Chinese Optics*, 2022, **15**(6): 1228–1242.
- [60] Taki M, Kajiwaru K, Yamaguchi E, et al. Fused thiophene-S, S-dioxide-based super-photostable fluorescent marker for lipid droplets[J]. *ACS Materials Letters*, 2021, **3**(1): 42–49.
- [61] Zhou R, Wang C G, Liang X S, et al. Stimulated emission depletion (STED) super-resolution imaging with an advanced organic fluorescent probe: visualizing the cellular lipid droplets at the unprecedented nanoscale resolution[J]. *ACS Materials Letters*, 2021, **3**(5): 516–524.
- [62] Liu G N, Peng G S, Dai J N, et al. STED nanoscopy imaging of cellular lipid droplets employing a superior organic fluorescent probe[J]. *Analytical Chemistry*, 2021, **93**(44): 14784–14791.
- [63] Zhou R, Liu G N, Li D, et al. An advanced organic molecular probe for multimodal fluorescence imaging of cellular lipid droplets[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2023, **387**: 133772.
- [64] Chen J, Wang C, Liu W J, et al. Stable super-resolution imaging of lipid droplet dynamics through a buffer strategy with a hydrogen-bond sensitive fluorogenic probe[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2021, **60**(47): 25104–25113.
- [65] Bucevičius J, Lukinavičius G, Gerasimaitė R. The use of hoechst dyes for DNA staining and beyond[J]. *Chemosensors*, 2018, **6** (2): 18.
- [66] Nakamura A, Takigawa K, Kurishita Y, et al. Hoechst tagging: a modular strategy to design synthetic fluorescent probes for live-cell nucleus imaging[J]. *Chemical Communications*, 2014, **50**(46): 6149–6152.
- [67] Lukinavičius G, Blaukopf C, Pershagen E, et al. SiR-Hoechst is a far-red DNA stain for live-cell nanoscopy[J]. *Nature Communications*, 2015, **6**: 8497.
- [68] Zhang X D, Ye Z W, Zhang X F, et al. A targetable fluorescent probe for dSTORM super-resolution imaging of live cell nucleus DNA[J]. *Chemical Communications*, 2019, **55**(13): 1951–1954.
- [69] Bucevičius J, Keller-Findeisen J, Gilat T, et al. Rhodamine-Hoechst positional isomers for highly efficient staining of heterochromatin[J]. *Chemical Science*, 2019, **10**(7): 1962–1970.
- [70] Bucevičius J, Gilat T, Lukinavičius G. Far-red switching DNA probes for live cell nanoscopy[J]. *Chemical Communications*, 2020, **56**(94): 14797–14800.
- [71] Xu J Q, Sun X J, Kim K, et al. Ultrastructural visualization of chromatin in cancer pathogenesis using a simple small-molecule fluorescent probe[J]. *Science Advances*, 2022, **8**(9): eabm8293.
- [72] Liu J J, Gu Q M, Du W, et al. Nucleolar RNA in action: ultrastructure revealed during protein translation through a terpyridyl manganese(II) complex[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2022, **203**: 114058.
- [73] Qiao Q L, Liu W J, Chi W J, et al. Modulation of dynamic aggregation in fluorogenic SNAP-tag probes for long-term super-resolution imaging[J]. *Aggregate*, 2023, **4**(2): e258.