

文章编号: 1006-3080(2025)06-0757-08

DOI: 10.14135/j.cnki.1006-3080.20250217002

全可见光调控二芳基乙烯光响应探针用于溶酶体 STORM 成像

卞欣筠, 李方慧, 赵伟军

(华东理工大学化学与分子工程学院, 精细化工研究所, 上海 200237)

摘要: 随机光学重建显微镜(STORM)突破了传统光学成像的衍射极限, 可实现纳米级精度的生物成像。二芳基乙烯因其可逆性、热稳定性和抗疲劳性而成为重要的光开关材料, 但现有 STORM 探针多依赖光毒性的紫外光调控荧光态, 且缺乏细胞器靶向能力。为解决这些问题, 本文提出一种新型 STORM 探针设计策略: 在二芳基乙烯一侧引入具有分子内质子转移(IPT)效应的荧光团, 另一侧修饰溶酶体靶向基团, 成功构建了全可见光调控的探针 HMN。HMN 可在 488 nm 激光下激活荧光, 在 561 nm 光照下关闭荧光, 实现无需添加剂的明暗态可逆切换, 并表现出优异的抗疲劳性和灵敏的光开关特性。同时, HMN 具有准确的溶酶体靶向能力, 可用于活细胞中溶酶体的高分辨 STORM 成像。基于 HMN 的全可见光 STORM 成像不仅能够描绘溶酶体的亚细胞分布, 而且实现了单个溶酶体高达 99 nm 的成像分辨率。

关键词: 随机光学重建显微镜; 光致变色; 二芳基乙烯; 分子内质子转移; 全可见光; 溶酶体

中图分类号: O069

文献标志码: A

随机光学重建显微镜 (STORM) 是基于单分子定位的超分辨成像技术, 能够突破衍射极限, 在分子尺度上进行生物成像^[1-3]。该技术需要使用光开关荧光分子, 随机激活荧光团子集, 对其成像并进行光漂白, 实现荧光团的 ON/OFF 闪烁, 通过在时间上的分离, 得到空间上不重叠的单分子定位, 最终合并重构形成超分辨率图像^[4-7]。二芳基乙烯是一种具有优异抗疲劳性和双热稳定性的光响应开关, 且在荧光的可逆调控过程中无需添加任何稳定剂, 因此被广泛应用于超分辨成像领域^[2, 8-11]。

溶酶体是一种球形的细胞器, 能够协调细胞生长、分裂和存活, 是在活细胞中介导细胞代谢、维持细胞稳态的一种高度动态结构^[12-13]。溶酶体的功能障碍与人类疾病的发生密切相关, 且其在发挥作用时能够融合和快速增长^[14]。传统的荧光成像作为一种非侵入性的成像方法, 由于其具有灵敏度高、时空分辨率高、实时跟踪的优点, 已应用于可视化溶酶体

在细胞内的分布情况^[15-17]。但由于光的衍射, 限制了传统光学显微镜的分辨率约为 200 nm, 因而无法观察到小于该极限的亚细胞结构。因此, 通过溶酶体的超分辨率成像能够在纳米级的尺度上观察到其精细结构。

近年来, 国际学界针对二芳基乙烯类光致变色化合物在超分辨成像领域的应用取得显著突破。文献 [2] 选用砜结构的二芳基乙烯, 通过侧端芳基的修饰构建了低聚集、水溶液条件下的高效光开关, 实现了微管蛋白的 STORM 成像。朱明强课题组^[18-19]提出了一种基于萘酰亚胺-二芳基乙烯的光致变色聚合物, 用于溶酶体的超分辨率单分子定位显微镜 (SMLM) 成像, 并进一步将二芳基乙烯与聚集诱导发光 (AIE) 基团结合, 构成具有 AIE 活性的新型荧光开关, 用于可视化胶束的自组装过程。然而, 基于二芳基乙烯的超分辨成像试剂大多数仍需要使用紫外光激发, 当其运用于生物成像时, 会对细胞造成损伤,

收稿日期: 2025-02-17

基金项目: 国家自然科学基金基础科学中心项目 (T2488302)

作者简介: 卞欣筠(2000—), 女, 福建人, 硕士生, 主要从事光致变色分子的合成与性能研究。E-mail: b1433426926@163.com

通信联系人: 赵伟军, E-mail: zhwj@ecust.edu.cn

引用本文: 卞欣筠, 李方慧, 赵伟军. 全可见光调控二芳基乙烯光响应探针用于溶酶体 STORM 成像 [J]. 华东理工大学学报(自然科学版), 2025, 51(6): 757-764.

Citation: BIAN Xinyun, LI Fanghui, ZHAO Weijun. All-Visible-Light Activated Diarylethene Photoresponsive Probe for Lysosomal STORM Imaging[J]. Journal of East China University of Science and Technology, 2025, 51(6): 757-764.

且会被非选择性地吸收,限制了其在生物成像中的应用。本工作将二芳基乙烯与具有分子内质子转移(IPT)效应的荧光团相结合,将二芳基乙烯开环体的吸收扩展至可见光区^[20],基于分子内能量转移(ET)机理,实现全可见光调控的荧光开关体系,并在光响应荧光团的另一侧修饰溶酶体的靶向单元,将这种高效的光响应荧光开关进一步运用于溶酶体的超分辨成像。

1 实验部分

1.1 原料和试剂

2-甲基噻吩:分析纯,上海麦克林生化科技有限公司;N-溴代琥珀酰亚胺(NBS):分析纯,国药集团化学试剂有限公司;正丁基锂(*n*-BuLi):分析纯,上海百灵威化学技术有限公司;八氟环戊烯:分析纯,梯希爱化成工业发展公司;四(三苯基膦)钯(Pd(PPh₃)₄):分析纯,上海百灵威化学技术有限公司;苯胺:分析纯,国药集团化学试剂有限公司;双联频哪醇硼酸酯:分析纯,上海众何化学科技有限公司;1,1'-二二苯基膦二茂铁二氯化钯(PdCl₂(dppf)):分析纯,上海众何化学科技有限公司;超干四氢呋喃(THF)、二氯甲烷(DCM)、二甲基亚砜(DMSO)、无水乙醇(EtOH)、石油醚(PE)、氘代氯仿(CDCl₃):分析纯,上海泰坦科技股份有限公司。

1.2 测试与表征

核磁共振波谱仪:德国 Bruker 公司, Bruker Avance III 超导傅里叶变换核磁共振波谱仪(400 MHz、600 MHz),采用四甲基硅烷(TMS)作为内标物,CDCl₃作为氘代溶剂进行测试,测试温度为室温;电喷雾高分辨质谱仪:美国 Waters 公司, Waters LCT Premier XE 型,采用甲醇作为溶剂进行测试,测试温度为室温。紫外-可见分光光度计:美国 Varian 公司, Varian Cary 500 型,测试温度为室温;荧光光谱仪:美国 Varian 公司, Varian Cary Eclipse 型,测试温度为室温;单色仪:美国 Ocean Optics 公司, Monoscan 200 型;Hg/Xe 灯:日本 Hamamatsu 公司, LC8 Lightningcure 型;生物安全柜:赛默飞世尔科技公司, 1300 系列 II 级 A2 型生物安全柜;共聚焦荧光显微镜:德国徕卡公司, Lecia STELLARIS8 型;酶标仪:美国 BioTek 仪器有限公司, Synergy H4 型。

1.3 化合物 HMN 的合成

1.3.1 化合物 HMN 的分子设计与合成路线 本工作将光响应单元二芳基乙烯与具有 IPT 效应的荧光团相结合,将开环体的吸收扩展至可见光区,实现全可

见光调控的荧光开关体系。在该光响应荧光团上修饰溶酶体的靶向单元哌嗪基团,哌嗪的氨基可以通过质子化作用使荧光探针特异性地积累在酸性的溶酶体中^[21-22]。首先分别合成二芳基乙烯 BTE-1、IPT 荧光团侧链和哌嗪侧链,然后以化合物 BTE-1 为母体,采用 Suzuki 偶联反应将上述合成物相连,得到化合物 HMN。HMN 的具体合成路线如图 1 所示。

1.3.2 化合物 N2 的合成 将 NBS(47.00 g, 264.00 mmol) 溶解于 250 mL 醋酸溶液中,化合物 N1(13.00 g, 132.00 mmol) 溶于 25 mL 醋酸中并逐滴加入烧瓶,置于冰水浴中避光反应 12 h。反应结束后,将反应液缓慢加入饱和亚硫酸钠溶液中,用二氯甲烷进行萃取(100 mL×3),干燥有机相。柱层析分离选用石油醚作为展开剂,得到 38.10 g 的 N2 化合物,产率为 54%。¹H-NMR(400 MHz, CDCl₃, 293 K, δ): 2.34 (s, 3H), 6.85 (s, 1H)。

1.3.3 化合物 N3 的合成 在干燥且有氮气保护的 500 mL 三口烧瓶中,加入化合物 N2(22.30 g, 87.00 mmol) 和超干四氢呋喃溶剂(200 mL),在-78 °C 下搅拌 30 min 使其充分溶解。用注射器逐滴加入浓度为 2.50 mol/L 的正丁基锂溶液(42 mL, 104.00 mmol),低温反应 60 min,而后再逐滴加入三甲基氯硅烷(10.40 g, 96.00 mmol),保持低温反应 60 min,缓慢恢复至室温继续反应 2 h。反应结束后加入 20 mL 水,淬灭未反应的正丁基锂,减压除去四氢呋喃溶剂,用二氯甲烷进行萃取(100 mL×3),干燥有机相。柱层析分离选用石油醚作为展开剂,得到 10.00 g 的 N3 化合物,产率为 46%。¹H-NMR(400 MHz, CDCl₃, 293 K, δ): 2.42 (s, 3H), 7.01 (s, 1H)。

1.3.4 化合物 N4 的合成 在干燥且有氮气保护的 500 mL 三口烧瓶中,加入化合物 N3(7.60 g, 60.90 mmol) 和超干四氢呋喃溶剂(200 mL),在-78 °C 下搅拌 30 min 使其充分溶解。用注射器逐滴加入浓度为 2.50 mol/L 的正丁基锂溶液(14 mL, 36.30 mmol),反应 60 min,再加入八氟环戊烯(3.20 g, 15.10 mmol),保持低温反应 60 min,缓慢恢复室温继续反应 2 h。反应结束后加入 20 mL 水,淬灭未反应的正丁基锂,减压除去四氢呋喃溶剂,用二氯甲烷进行萃取(100 mL×3),干燥有机相。柱层析分离选用石油醚作为展开剂,得到 7.30 g 的 N4 化合物,产率为 24%。¹H-NMR(400 MHz, CDCl₃, 293 K, δ): 0.26 (m, 18H, overlap), 1.90 (s, 6H), 7.05 (s, 2H)。

1.3.5 化合物 BTE-1 的合成 在 250 mL 单口烧瓶中加入化合物 N4(7.30 g, 14.00 mmol),并溶解于 120 mL 二氯甲烷溶液中。将液溴(6.80 g, 43.00 mmol)溶于 25 mL

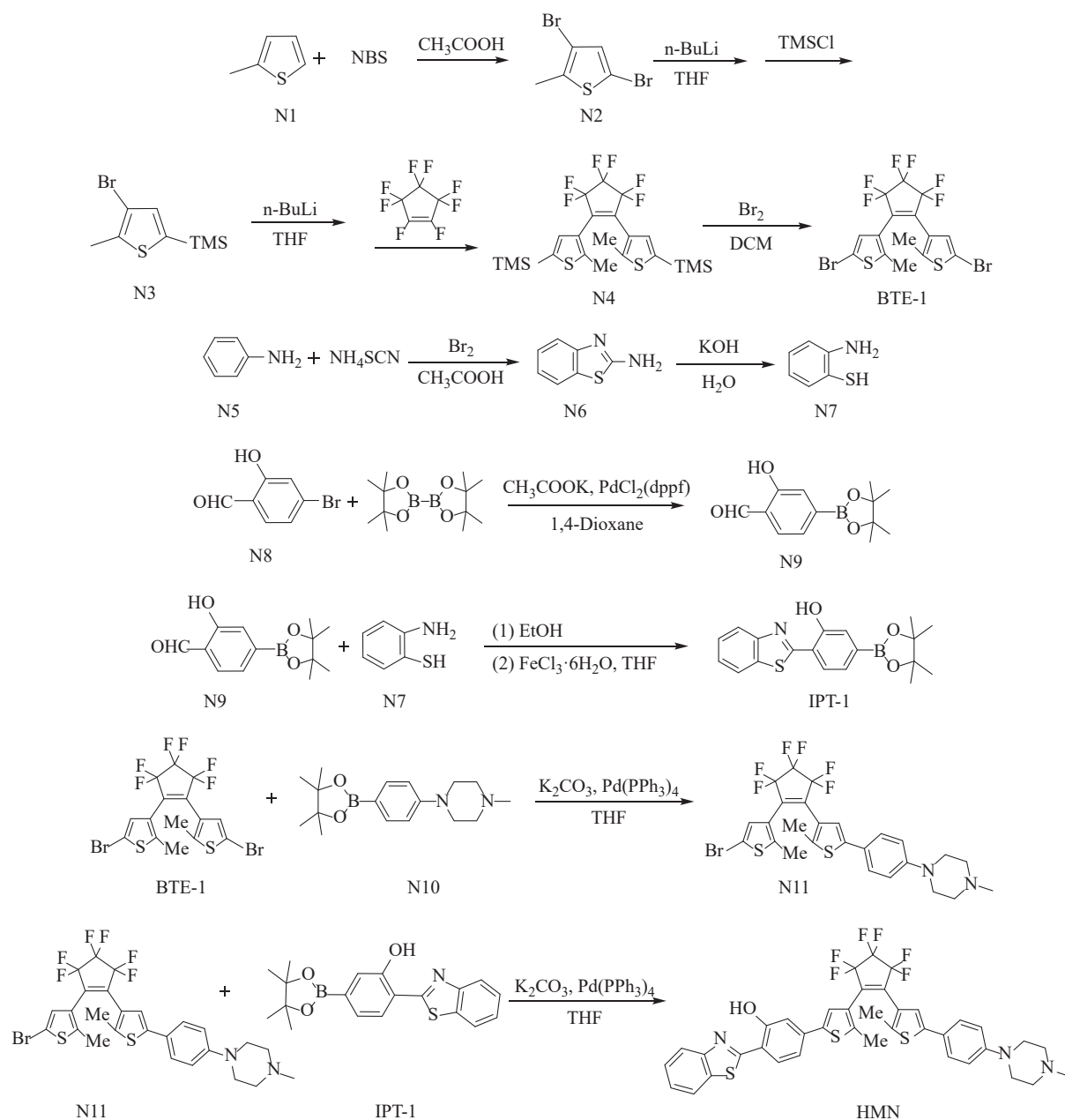


图1 HMN的合成路线

Fig. 1 Synthetic route of HMN

二氯甲烷中,并用恒压分液漏斗逐滴加入反应液中,室温反应 12 h。反应结束后将反应液缓慢加入饱和亚硫酸钠溶液中,用二氯甲烷进行萃取(100 mL \times 3),干燥有机相。柱层析分离选用石油醚作为展开剂,得到 3.20 g 的 BTE-1 化合物,产率为 43%。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , 293 K, δ): 1.88 (s, 6H), 7.01 (s, 2H)。

1.3.6 化合物 N6 的合成 在 250 mL 单口烧瓶中加入化合物 N5 (5.00 g, 53.70 mmol)、硫氰酸铵 (20.40 g, 268.40 mmol) 并溶解于 100 mL 醋酸溶液中,将液溴 (8.60 g, 53.70 mmol) 溶于 25 mL 醋酸溶液中,在冰浴条件下,用恒压分液漏斗逐滴加入反应液中,室温反应 12 h。反应结束后将反应液缓慢加入饱和亚硫酸

钠溶液中,并用饱和碳酸钠溶液中和和醋酸,当中和反应液为中性时,有大量沉淀析出,过滤、干燥,得到 N6 的粗产物,直接投入下一步反应。

1.3.7 化合物 N7 的合成 在 250 mL 单口烧瓶中加入上一步反应得到的含有 N6 的沉淀物 (4.00 g, 26.66 mmol),将其溶于 KOH 溶液 (8.90 g, 160.00 mmol) 中,加热至 110 $^{\circ}\text{C}$,回流反应 24 h。反应结束后,用盐酸溶液进行中和,当反应液为中性时,有大量沉淀析出,过滤、干燥,得到含有 N7 的粗产物,直接投入下一步反应。

1.3.8 化合物 N9 的合成 在 500 mL 三口烧瓶中加入化合物 N8 (10.00 g, 49.70 mmol)、双联频哪醇硼酸酯

(37.90 g, 149.20 mmol)、醋酸钾 (14.70 g, 149.20 mmol)、PdCl₂(dppf) (1.80 g, 2.50 mmol) 以及超干 1,4-二氧六环溶液 (200 mL), 在氮气保护下, 加热 85 °C 回流反应 24 h。反应结束后减压除去 1,4-二氧六环溶剂, 用二氯甲烷进行萃取 (100 mL×3), 干燥有机相。柱层析分离选用石油醚作为展开剂, 得到 7.50 g 的 N9 化合物, 产率为 61%。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, 293 K, δ): 1.35 (s, 12H), 7.41 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.55 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 9.92 (s, 1H), 10.82 (s, 1H)。

1.3.9 化合物 IPT-1 的合成 200 mL 单口烧瓶中加入化合物 N7 (1.00 g, 8.10 mmol)、化合物 N9 (5.60 g, 8.05 mmol), 并溶于乙醇溶剂 (80 mL) 中, 加热 95 °C 回流反应 6 h, 减压蒸馏除去乙醇溶剂, 再往反应瓶中加入 80 mL 四氢呋喃溶液和 FeCl₃·6H₂O (8.70 g, 32.20 mmol), 加热 85 °C, 回流反应 2 h。反应结束后, 减压除去四氢呋喃溶剂, 用二氯甲烷进行萃取 (100 mL×3), 干燥有机相。柱层析分离选用石油醚和乙酸乙酯的混合溶液 (石油醚与乙酸乙酯的体积比为 7 : 1) 作为展开剂, 得到 190 mg 的 IPT-1 化合物, 产率为 7%。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, 293 K, δ): 1.37 (s, 12H), 7.37 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.42 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.52 (dd, *J*₁ = 15.9 Hz, *J*₂ = 7.6 Hz, 2H), 7.69 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.92 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.99 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 12.39 (s, 1H)。

1.3.10 化合物 N11 的合成 在 200 mL 单口烧瓶中加入化合物 BTE-1 (1.00 g, 1.90 mmol)、N10 (460 mg, 1.50 mmol)、四 (三苯基膦) 钯 (44 mg, 0.04 mmol) 以及四氢呋喃溶液 (100 mL) 和碳酸钾水溶液 (2 mol/L, 10 mL), 在氮气保护下反应回流 12 h。反应结束后减压除去四氢呋喃溶剂, 用二氯甲烷进行萃取 (100 mL×3), 干燥有机相。柱层析分离选用乙酸乙酯和二氯甲烷的混合溶液 (乙酸乙酯与二氯甲烷的体积比为 5 : 1) 作为展开剂, 得到 230 mg 的 N11 化合物, 产率为 19%。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, 293 K, δ): 1.87 (s, 3H), 1.93 (s, 3H), 2.37 (s, 3H), 2.59 (m, 4H, overlap), 3.25 (m, 4H, overlap), 6.92 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.05 (s, 1H), 7.09 (s, 1H), 7.42 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H)。

1.3.11 目标化合物 HMN 的合成 在 200 mL 单口烧瓶中加入化合物 N11 (141 mg, 0.23 mmol)、IPT-1 (96 mg, 0.27 mmol)、四 (三苯基膦) 钯 (13 mg, 0.01 mmol) 以及四氢呋喃溶液 (100 mL) 和碳酸钾水溶液 (2 mol/L, 10 mL)。在氮气保护下反应回流 12 h。反应结束后减压除去四氢呋喃溶剂, 用二氯甲烷进行萃取 (100 mL×3), 干燥有机相。柱层析分离选用乙酸乙酯和二氯甲烷的混合溶液 (乙酸乙酯与二氯甲烷的体积比为

5 : 1) 作为展开剂, 得到 120 mg 的 HMN 化合物, 产率为 69%。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, 293 K, δ): 1.97 (d, *J* = 11.0 Hz, 6H, -CH₃), 2.36 (s, 3H, -CH₃), 2.58 (m, 4H, overlap, -CH₂), 3.25 (m, 4H, overlap, -CH₂), 6.92 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H, phenyl-H), 7.15 (m, 2H, overlap, phenyl-H), 7.28 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H, phenyl-H), 7.42 (m, 4H, overlap), 7.53 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H, benzothiazole-H), 7.69 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, phenyl-H), 7.92 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, benzothiazole-H), 8.00 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, benzothiazole-H), 12.63 (s, 1H, -OH)。¹³C-NMR (600 MHz, CDCl₃, 293 K, δ): 1.00, 14.51, 14.65, 46.02, 46.12, 48.62, 54.92, 114.19, 115.87, 116.16, 116.78, 120.63, 121.54, 122.16, 123.79, 124.52, 125.63, 126.21, 126.51, 126.82, 129.02, 132.55, 137.36, 140.85, 142.61, 150.89, 151.84, 158.26, 168.63。HRMS [M+H]⁺: Calcd. for C₃₉H₃₂ON₃F₆S₃, 768.1606; Found, 768.1606。

2 结果与讨论

2.1 HMN 的光致变色性能

二芳基乙烯作为一种光致变色分子, 在紫外光和可见光的照射下, 能够在开环和闭环异构体之间发生可逆的环化和开环反应。通过紫外-可见吸收光谱对 HMN 的光致变色性能的研究如图 2 所示。由图 2(a) 可见, 开环体 o-HMN 分子在 332 nm 处具有最大吸收波长, 与传统二芳基乙烯开环体吸收不同的是, 在可见光区 456 nm 处具有一个额外的吸收峰, 这是由于在 DMSO 溶剂中, HMN 分子的分子内质子进行转移引起的。HMN 分子侧链为 IPT 荧光团, 其具有酸性质子供体酚羟基与碱性质子受体噻唑上的 N 原子, 活泼氢通过分子内氢键, 从氧原子转移至苯并噻唑的氮原子上, 对应烯醇式构型转变为酮式构型, 酮式构型的吸收红移至可见光区^[21]。尽管已有文献报道 IPT 分子基态的烯醇-酮式互变异构的反应速率极快, 但极性大的有机溶剂有利于稳定酮式构型, 故在可见光区观察到酮式构型对应的吸收峰^[23-24]。

在紫外光 ($\lambda = (365 \pm 10)$ nm) 的照射下, 开环体于 332 nm 和 456 nm 处的吸收逐渐降低, 同时可见光区 662 nm 处出现一个较宽的吸收峰并逐渐增强, 这是由于 o-HMN 分子发生光环化反应, 生成了具有更大 π 共轭结构的闭环体 c-HMN 分子, 溶液由浅黄色变为蓝色。使用紫外光 ($\lambda = (365 \pm 10)$ nm) 发生闭环反应时, o-HMN 分子的闭环量子效率为 41.3% (表 1), 由于传统二芳基乙烯的平行构象和反平行构象同时存在, 故闭环量子效率通常小于 50%^[25]。达到光稳

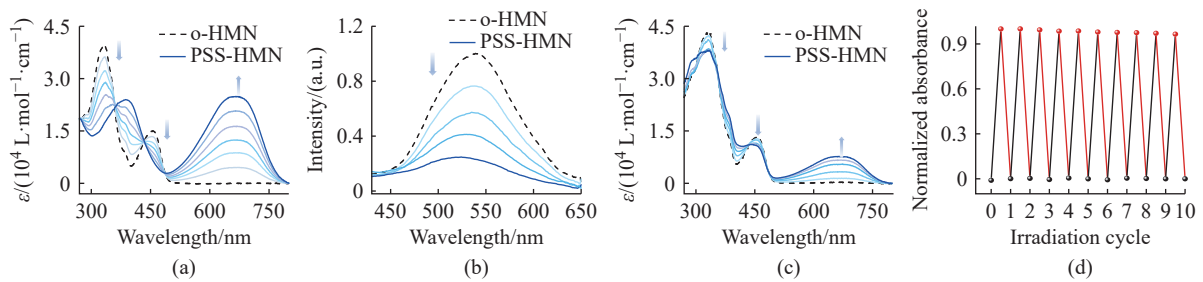


图2 HMN的二甲基亚砜溶液在紫外光($\lambda = (365 \pm 10)$ nm)的照射下,吸收(a)和荧光(b)的谱图变化,荧光激发波长为332 nm; (c) HMN的二甲基亚砜溶液在可见光($\lambda = (441 \pm 10)$ nm)的照射下,吸收谱图的变化; (d) HMN的二氯甲烷溶液在紫外光($\lambda = (365 \pm 10)$ nm)和可见光($\lambda > 490$ nm)交替照射下, HMN的吸光度变化

Fig. 2 (a) Absorption and (b) fluorescence spectra changes of HMN in dimethyl sulfoxide solution upon irradiation with UV light ($\lambda = (365 \pm 10)$ nm), excitation for fluorescence is set at 332 nm; (c) Absorption spectra changes of HMN in dimethyl sulfoxide solution upon irradiation with visible light ($\lambda = (441 \pm 10)$ nm); (d) Absorbance changes of HMN in dichloromethane solution upon irradiation with UV light ($\lambda = (365 \pm 10)$ nm) and visible light ($\lambda > 490$ nm), alternatively

态 (Photostationary State, PSS) 时, HMN 分子的转化率为 94.4%。由于 o-HMN 分子在可见光区域能够被吸收, 表明该分子具有全可见光调控光致变色的可能性。当用可见光 ($\lambda = (441 \pm 10)$ nm) 照射 o-HMN 分子时, 如图 2 (c) 所示, 开环体的吸收逐渐降低, 并在可见光区 662 nm 处出现一个较宽的吸收峰, 这表明可见光能够驱动 HMN 分子发生光致变色反应, 且该条件下的闭环量子效率为 26.8%, PSS 态的转化率为 24.3% (表 1)。当采用 450 nm 可见光诱导闭环反应时, 由于该波长下反应体系的摩尔吸光系数 (ϵ) 降低至 1.47×10^4 L/(mol·cm), 体系对光的利用率下降, 使得闭环反应的转化率降低。使用可见光 ($\lambda = (546 \pm 10)$ nm) 照射 c-HMN 分子时发生开环反应, 开环量子效率为 0.5% (表 1), 且 HMN 经过 10 个光异构化的循环后, 如图 2 (d) 所示, 吸光度并未发生明显降低, 表明其具有优秀的抗疲劳性能, 可运用于超分辨成像。

表 1 不同波长光照射 HMN 的光谱数据

Table 1 Spectroscopic data of HMN irradiated with light of different wavelengths

| Photocyclization | | | Photocycloreversion | | |
|---------------------------------------|--------------------------|-----------------------------|---------------------------------------|--------------------------|-----------------------------|
| $\lambda_{\text{irr}}^{1)}/\text{nm}$ | $C_{\text{o-c}}^{2)}/\%$ | $\Phi_{\text{o-c}}^{3)}/\%$ | $\lambda_{\text{irr}}^{1)}/\text{nm}$ | $C_{\text{c-o}}^{2)}/\%$ | $\Phi_{\text{c-o}}^{3)}/\%$ |
| 365 ± 10 | 94.4 | 41.3 | 546 ± 10 | > 99 | 0.5 |
| 441 ± 10 | 24.3 | 26.8 | | | |

1) Irradiation wavelength; 2) Conversion rate from o-HMN to c-HMN ($C_{\text{o-c}}$) and from c-HMN to o-HMN ($C_{\text{c-o}}$); 3) Quantum yield from o-HMN to c-HMN ($\Phi_{\text{o-c}}$) and from c-HMN to o-HMN ($\Phi_{\text{c-o}}$)

开环体 o-HMN 分子在 539 nm 处发出绿色荧光, 激发波长为 332 nm。当用 365 nm 紫外光照射开环体 o-HMN 分子时, 由于闭环体的生成, 荧光强度逐渐降低, 且达到光稳态时其荧光对比度为 17.7。这

是由于 IPT 荧光团的发射带与二芳基乙烯闭环体的吸收带发生重叠, 故当 HMN 分子处于开环态时, 显示 IPT 荧光团的荧光, 当光环化生成闭环体时, 分子内的能量从 IPT 荧光团转移至二芳基乙烯闭环体, 从而淬灭荧光, 实现光控荧光开关体系^[26-27]。

2.2 目标化合物 HMN 的生物成像

2.2.1 细胞毒性实验 通过使用 CCK-8 检测方法, 评估 HMN 分子的细胞毒性。将 HeLa 细胞以 5000 个/孔的密度接种至 96 孔板中, 在 37 °C 以及 5% (体积分数) CO_2 的条件下培养 24 h, 然后加入不同浓度 (4、8、12、16、20 $\mu\text{mol/L}$) 的 HMN 分子孵育 6 h, 而后加入 100 μL CCK-8 试剂 (体积分数 10%) 继续培养 1 h, 通过酶标仪测定 450 nm 处的吸光度。如图 3 所示, HeLa 细胞仍保持较高的细胞活性, 表明 HMN 分子具有良好的生物相容性, 适用于细胞成像实验。

2.2.2 HMN 分子共定位成像 本工作使用共聚焦荧光显微镜观察 HMN 分子在活细胞中的分布行为, 通过与溶酶体商业探针的共定位成像实验, 研究 HMN 分子对溶酶体的靶向能力。在 HeLa 细胞中,

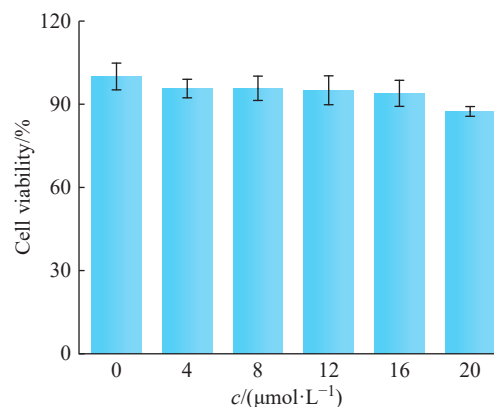


图3 HMN 分子孵育 HeLa 细胞 6 h 的细胞活性

Fig. 3 Cell viability of HeLa cells incubated with HMN molecules for 6 h

先用 HMN 分子 (20 $\mu\text{mol/L}$) 孵育 20 min, 再用市售溶酶体红色荧光探针 LysoTracker Red (100 nmol/L) 孵育 10 min, 对细胞洗涤后进行成像。使用 405 nm 的激光激发 HMN 分子, 波长为 577 nm 的激光激发溶酶体红色荧光探针, 并调整二者的接收通道不发生重叠, 避免信号串扰。如图 4 所示, 在绿色通道和红色通道中均观察到明显的荧光信号, 且两个通道合并后的图像具有明显的重叠区域, 通过计算可知皮尔逊相关系数为 0.84, 表明 HMN 分子能够选择性地定位溶酶体。图 4 (b) 所示为图 4 (a) 中蓝色短线所标注区域的荧光强度曲线, 两条曲线显示了二者

发光的位置及归一化强度, 两条曲线的高重合度进一步证明 HMN 分子的溶酶体靶向能力。

2.2.3 HMN 分子在细胞中的超分辨成像应用 基于 HMN 分子对溶酶体良好的靶向性及其优异的光响应荧光开关行为, 将 HMN 分子运用于溶酶体的超分辨成像中。HMN 分子作为溶酶体靶向探针, 通过双可见光光束调控分子荧光开关, 用 488 nm 激光随机激活点亮分子, 再用 561 nm 的激光使其恢复暗态, 实现 ON/OFF 的荧光闪烁, 而后通过图像重构得到超分辨率的 STORM 图像。图 5(a) 所示为 HeLa 细胞的传统宽场成像和 STORM 成像, 图 5(b)、(c) 所示为

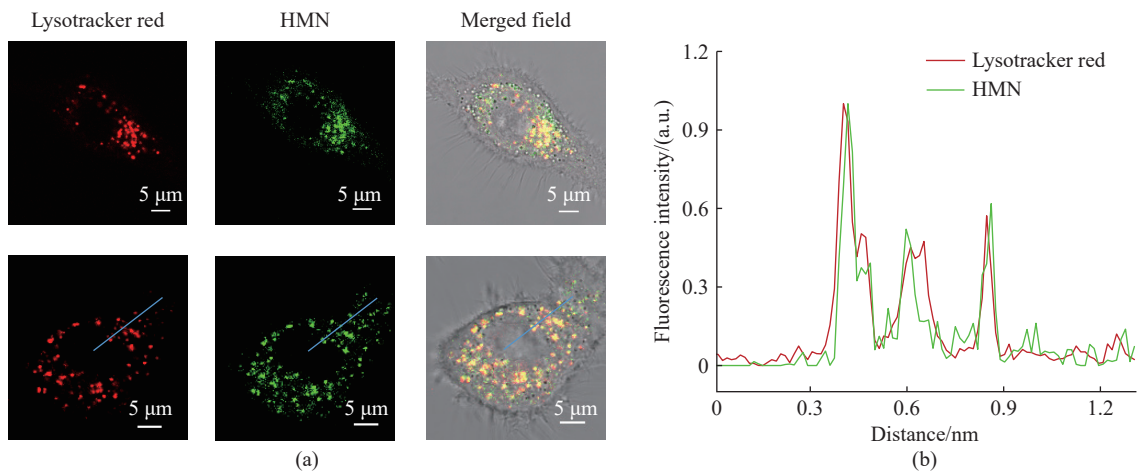


图 4 (a) 用 HMN 和溶酶体红色荧光探针在 HeLa 细胞中孵育后的共聚焦荧光显微镜成像; (b) 图 (a) 中蓝色短线标记区域的荧光强度分布

Fig. 4 (a) Confocal fluorescence microscopy imaging of HeLa cells incubated with HMN and lysotracker red; (b) Distribution of fluorescence intensity in areas marked with blue short lines on image (a)

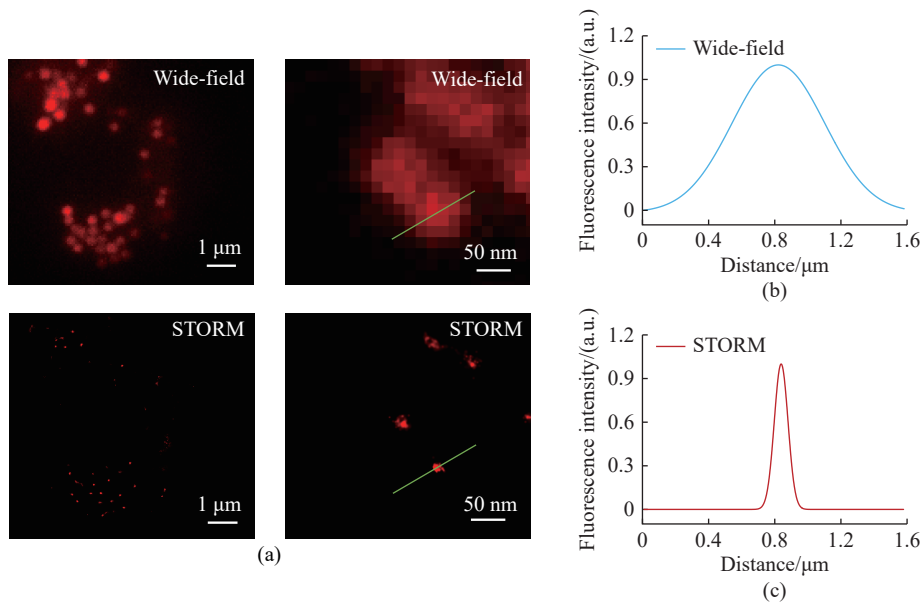


图 5 (a) HeLa 细胞的传统宽场成像与 STORM 成像图片; (b) 宽场成像和 (c) STORM 成像中绿色短线标记区域的荧光强度分布

Fig. 5 (a) Conventional wide-field and STORM images of the HeLa cell; Fluorescence intensity distribution of the regions marked with green short lines in wide-field imaging (b) and STORM imaging (c)

图5(a)中绿色短线标记部分的荧光强度分布拟合曲线,由拟合曲线可计算出单个溶酶体的成像分辨率。进行宽场成像时,可观察到单个溶酶体的大小约为1.646 μm ,而STORM成像显示单个溶酶体的大小约为99 nm,分辨率提升了15.6倍,突破了传统光学衍射极限,观察到溶酶体的精细结构。

3 结论

本工作通过在二芳基乙烯光响应单元上修饰具有IPT效应的荧光团和溶酶体的靶向基团,构建了全可见光调控的荧光探针HMN,实现了对溶酶体的超分辨成像。将二芳基乙烯与具有IPT效应的荧光团相结合, IPT 荧光发射光谱和二芳基乙烯闭环体吸收光谱存在重叠,二者能够发生分子内能量转移,实现了全可见光调控的荧光开关体系,有效减少了紫外线对细胞造成的损伤,打破二芳基乙烯对于生物成像的限制。通过在光响应荧光团上修饰溶酶体的靶向单元,构建溶酶体良好靶向能力的光响应荧光探针,并将其运用于溶酶体的超分辨成像,单个溶酶体的分辨率为99 nm,相较于传统宽场成像的分辨率提升了15.6倍。

参考文献:

- [1] GU X, ZHAO E, ZHAO T, *et al.* A mitochondrion-specific photoactivatable fluorescence turn-on AIE-based bioprobe for localization super-resolution microscope[J]. *Advanced Materials*, 2016, 28(25): 5064-5071.
- [2] ROUBINET B, WEBER M, SHOJAEI H, *et al.* Fluorescent photoswitchable diarylethenes for biolabeling and single-molecule localization microscopies with optical superresolution[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2017, 139(19): 6611-6620.
- [3] XU K, ZHONG G, ZHUANG X. Actin, spectrin, and associated proteins form a periodic cytoskeletal structure in axons[J]. *Science*, 2013, 339(6118): 452-456.
- [4] PATTERSON G, DAVIDSON M, MANLEY S, *et al.* Superresolution imaging using single-molecule localization[J]. *Annual Review of Physical Chemistry*, 2010, 61(1): 345-367.
- [5] JRADI F M, LAVIS L D. Chemistry of photosensitive fluorophores for single-molecule localization microscopy [J]. *ACS Chemical Biology*, 2019, 14(6): 1077-1090.
- [6] LELEK M, GYPARAKI M T, BELIU G, *et al.* Single-molecule localization microscopy[J]. *Nature Reviews Methods Primers*, 2021, 1(1): 1-39.
- [7] RUST M J, BATES M, ZHUANG X. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (storm)[J]. *Nature Methods*, 2006, 3(10): 793-796.
- [8] WU Z H, ZHU X, YANG Q, *et al.* Near-infrared perylene-carboximide fluorophores for live-cell super-resolution imaging[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2024, 146(11): 7135-7139.
- [9] LI H, VAUGHAN J C. Switchable fluorophores for single-molecule localization microscopy[J]. *Chemical Reviews*, 2018, 118(18): 9412-9454.
- [10] IRIE M, FUKAMINATO T, MATSUDA K, *et al.* Photochromism of diarylethene molecules and crystals: Memories, switches, and actuators[J]. *Chemical Reviews*, 2014, 114(24): 12174-12277.
- [11] ROUBINET B, BOSSI M L, ALT P, *et al.* Carboxylated photoswitchable diarylethenes for biolabeling and super-resolution resolt microscopy[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2016, 55(49): 15429-15433.
- [12] PERERA R M, ZONCU R. The lysosome as a regulatory hub[J]. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 2016, 32(1): 223-253.
- [13] DUAN X, TONG Q, FU C, *et al.* Lysosome-targeted fluorescent probes: Design mechanism and biological applications[J]. *Bioorganic Chemistry*, 2023, 140: 106832.
- [14] LI X, FAN M, WANG Z, *et al.* Bodipy-based NIR trackers with acidity-driven amphiphilicity for sted super-resolution imaging of lysosomal membranes[J]. *Analytical Chemistry*, 2024, 96: 2958-2967.
- [15] CHEN T, CHEN Z, LIU R, *et al.* A NIR fluorescent probe for detection of viscosity and lysosome imaging in live cells[J]. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2019, 17(26): 6398-6403.
- [16] LI L, XIONG Z, DANG Y, *et al.* A red-emissive D-A-D type fluorescent probe for lysosomal pH imaging[J]. *Analytical Methods*, 2020, 12(23): 2978-2984.
- [17] LIU Y Z, ZHANG H, ZHOU D H, *et al.* Migration from lysosome to nucleus: Monitoring lysosomal alkalization-related biological processes with an aminofluorene-based probe[J]. *Analytical Chemistry*, 2023, 95(18): 7294-7302.
- [18] LI C, HU Z, ALDRED M P, *et al.* Water-soluble polymeric photoswitching dyads impart super-resolution lysosome highlighters[J]. *Macromolecules*, 2014, 47(24): 8594-8601.
- [19] LI C, XIONG K, CHEN Y, *et al.* Visible-light-driven photoswitching of aggregated-induced emission-active diarylethenes for super-resolution imaging[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2020, 12(24): 27651-27662.
- [20] IJIMA T, MOMOTAKE A, SHINOHARA Y, *et al.* Excited-state intramolecular proton transfer of naphthalene-fused 2-(2'-hydroxyaryl)benzazole family[J]. *The Journal of Physical Chemistry A*, 2010, 114(4): 1603-1609.

- [21] ZHANG L, GUO J, YOU Q, *et al.* A water-soluble fluorescent pH probe and its application for monitoring lysosomal pH changes in living cells[J]. *Analytical Methods*, 2023, 15(25): 3057-3063.
- [22] LV Z, MAN Z, CUI H, *et al.* Red AIE luminogens with tunable organelle specific anchoring for live cell dynamic super resolution imaging[J]. *Advanced Functional Materials*, 2020, 31(10).
- [23] DAS B, CHAKRABORTY A, CHAKRABORTY S. Experimental and theoretical investigation of ground state intramolecular proton transfer (GSIPT) in salicylidene-aniline schiff base derivatives in polar protic medium[J]. *Spectrochimica Acta: Part A. Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2020, 225: 117443.
- [24] KUANG Z, GUO Q, WANG X, *et al.* Ultrafast ground-state intramolecular proton transfer in diethylamino-hydroxyflavone resolved with pump-dump-probe spectroscopy[J]. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 2018, 9(15): 4174-4181.
- [25] 李萌祺, 张志鹏, 朱为宏. 位阻和电子效应对位阻型二芳基乙烯光响应性能的影响 [J]. 华东理工大学学报 (自然科学版), 2020, 46(5): 642-652.
- [26] NAKAHAMA T, MUKAIYAMA T, KITAGAWA D, *et al.* Solvent effect of fluorescence on/off switching of diarylethene linked to excited-state intramolecular proton transfer fluorophore[J]. *Research on Chemical Intermediates*, 2017, 43(10): 5321-5336.
- [27] KONO L, NAKAGAWA Y, FUJIMOTO A, *et al.* Aggregation-induced emission effect on turn-off fluorescent switching of a photochromic diarylethene[J]. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 2019, 15: 2204-2212.

All-Visible-Light Activated Diarylethene Photoresponsive Probe for Lysosomal STORM Imaging

BIAN Xinyun, LI Fanghui, ZHAO Weijun

(Institute of Fine Chemicals, School of Chemistry and Molecular Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract: Stochastic optical reconstruction microscopy (STORM) breaks through the diffraction limit of conventional optical imaging, enabling visualization of biological processes with nanoscale precision. Diarylethene derivatives have attracted particular attention due to their remarkable reversibility, excellent thermal stability, and fatigue resistance. Photoswitchable diarylethene compounds with easy modification and tunable fluorescence eliminate the need for additives in single-molecule localization techniques, opening new development opportunities in STORM imaging. However, most diarylethene probes currently used for STORM imaging typically require a phototoxic ultraviolet (UV) laser to regulate the transition between fluorescent and dark states, and they lack organelle recognition capability. Herein, we propose a novel design strategy for STORM fluorescent probes. By conjugating an intramolecular proton transfer (IPT) fluorophore on one side and a lysosomal targeting group on the other with diarylethene, we successfully synthesized the molecule HMN. This probe not only regulates fluorescence blinking between bright and dark states using harmless all-visible light but also exhibits excellent lysosome-targeting capability, which facilitates intracellular STORM imaging of lysosomes. HMN demonstrates outstanding fatigue resistance, sensitive fluorescence switching, and accurate lysosome recognition. Its fluorescence can be activated by a 488 nm laser and deactivated by a 561 nm laser, without requiring any additives in the imaging medium. Using the photoresponsive probe HMN, we achieved all-visible-light STORM imaging, which helps determine the subcellular distribution of lysosomes and enables super-resolution imaging of individual lysosomes with a resolution of up to 99 nm.

Key words: stochastic optical reconstruction microscopy; photochromism; diarylethene; intramolecular proton transfer; all-visible light; lysosome

(责任编辑: 张欣)