有机小分子荧光探针检测核酸的研究进展

漆亚林[†], 王海蓉[†], 曹玉瑶, 朱海亮^{*}

南京大学生命科学学院, 医药生物技术国家重点实验室, 南京 210023

[†] 同等贡献

^{*} 联系人, E-mail: zhuhl@nju.edu.cn

收稿日期: 2021-07-26; 接受日期: 2021-09-16; 网络版发表日期: 2022-01-04

国家水体污染控制与治理科技重大专项(批准号: 2017ZX07602-002)资助

摘要 核酸(nucleic acids, NAs)是脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid, DNA)和核糖核酸(ribonucleic acid, RNA)的总称, 它是许多核苷酸单体聚合成的生物大分子物质, 在生命体的生长、发育和繁殖过程中起着至关重要的作用. 随着荧光成像技术的发展, 有机小分子荧光探针逐渐成为细胞、组织及活体内核酸识别以及可视化成像的有力工具. 本文以识别核酸的有机小分子荧光探针的荧光母核为主线, 对近年来(2000~2021)该类探针的研究进展进行了系统综述, 并且对其设计思路、反应机理和生物应用进行了概括. 最后, 对未来有机小分子荧光探针识别核酸的研究领域进行了展望.

关键词 有机小分子荧光探针, 核酸, 脱氧核糖核酸, 核糖核酸, 荧光成像

核酸(nucleic acids, NAs), 包括核糖核酸(ribonucleic acid, RNA)和脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid, DNA), 在基因表达中起着重要的作用, 并且是真核细胞中遗传信息存储、复制和表达的主要物质基础^[1]. 另外, 在生物体内, 细胞增殖、分化、功能和发育是通过核酸实现的^[2]. 所以, 开发检测和识别核酸的有效工具对于疾病的发现和诊断具有十分重大的意义.

随着双光子荧光共聚焦显微成像技术和近红外成像技术的开发和利用^[3,4], 荧光成像技术近年来得到迅猛发展. 而且荧光成像技术因具有灵敏度高、实时响应、高时空分辨率和非侵入性等特点^[5], 越来越受到关注. 又由于有机小分子荧光探针具有生物相容性

好、高度专一性、良好的细胞通透性和能够进行动态实时监测等优点^[6], 有机小分子荧光探针在识别核酸和实现核酸可视化成像的研究领域得到极大的发展(图1). 同时, 有机小分子荧光探针在通过识别核酸来了解基因表达以及随之导致的细胞功能异常或改变等方面有着巨大的潜力^[7]. 目前, 已开发多种RNA和DNA的商业染料, 例如噻唑橙(thiazole orange, TO)^[8]、碘化丙啶(propidium iodide, PI)^[9]、4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)^[10]和Hoechst 33342^[11]等. 但是, 因为大部分商业染料激发波长短、光稳定差、易漂白和细胞毒性大等缺点, 限制了此类染料的进一步应用. 另外, 大多数有机小分子荧光探针无法区分不同序列的核酸以及单碱基错配核酸, 在

引用格式: 漆亚林, 王海蓉, 曹玉瑶, 等. 有机小分子荧光探针检测核酸的研究进展. 中国科学: 生命科学, 2022, 52: 432–448

Qi Y L, Wang H R, Cao Y Y, et al. Progress in small-molecule fluorescent probes for nucleic acids (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2022, 52: 432–448, doi: 10.1360/SSV-2021-0269

图 1 检测核酸的有机小分子荧光探针的发文量. 检索方式: 所有数据来源于Web of Science数据库; 关键词: “fluorescent probe” and “nucleic acid” or “ribonucleic acid” or “deoxyribonucleic acid” or “DNA” or “RNA”

Figure 1 Number of published articles in the field of small-molecule fluorescent probes for nucleic acids. Query method: data from Web of Science; keywords: “Fluorescent probe” and “nucleic acid” or “ribonucleic acid” or “deoxyribonucleic acid” or “DNA” or “RNA”

生物和医学的应用上还需要探索和发展, 同时这些情况也表明, 有机小分子荧光探针在检测核酸领域面临着许多亟待解决的问题.

本文以识别核酸的有机小分子荧光探针的荧光母核为主线, 通过将该类探针分成以检测DNA, RNA, DNA和RNA, 同时检测DNA和其他生物分子, 以及同时检测RNA和其他生物分子五个类别, 系统概述了近年来识别核酸的有机小分子荧光探针的研究进展. 同时, 对其设计思路、反应机理和生物应用进行了概括. 最后, 对未来有机小分子荧光探针识别核酸的研究领域进行了展望.

1 设计思路、反应机理和生物应用

因为核酸是典型的阴离子聚电解质^[12], 所以已报道的检测核酸的有机小分子荧光探针主要带正电荷, 这种可以通过静电吸引作用促进探针与核酸的结合并同时“点亮”探针的荧光. 目前在报道的该类探针中, 荧光母核主要包括(苯并)咪唑、苯并呋喃、苯并噻唑、咪唑、半花菁、Isaindigotone和喹啉鎓等.

同时, 在已报道的文献中, 有机小分子荧光探针与核酸的结合模式主要包括结合在核酸的小沟中或者以

嵌入的方式导致该类探针荧光的开启. 另外, 在G-四链体与该类探针的结合过程中, 末端堆积效应会同样引起探针荧光的开启. 此外, 氢键、 π - π 堆积和电荷-电荷相互作用在核酸和探针的结合中也发挥着重要作用. 特别是, 对于具有聚集诱导效应特性的探针而言, 核酸与探针的结合会促使探针从聚焦体转为单体, 从而导致发射光信号的转变.

本文将目前已报道的检测核酸的有机小分子荧光探针分为三个阶段, 同时将未来报道的此类探针列为第四代(图2). 此类探针在发展过程中, 从细胞水平的可视化成像, 逐渐发展到实现组织和活体成像, 并且在亚细胞器水平实现了多细胞器的动态长时程观察, 例如线粒体DNA、溶酶体DNA和核仁DNA之间的动态检测, 这些突破性的进展为研究细胞活力和疾病机理提供了崭新的方法. 另外, 双光子成像技术以及具有近红外发射(650~900 nm)荧光团的设计合成^[13], 有利于提高荧光成像深度, 减少生物背景干扰和增加成像分辨率等, 极大地促进了有机小分子荧光探针在识别核酸领域的发展. 同时, 需要强调的是, 逐渐兴起的能够同时识别核酸和其他生物分子以及同时识别核酸和具有其他功能(例如光动力治疗)的多功能探针, 将分子识别、生物成像和治疗等结合起来, 扩大了该类探针的生物应用.

2 检测核糖核酸的有机小分子荧光探针

随着成像技术的进步, 检测核糖核酸的有机小分子荧光探针, 从最开始的仅识别核糖核酸的单一应用, 逐渐丰富起来(图3). 越来越多的此类探针开始深入应用于监测细胞的生命活动, 例如实现线粒体膜电位动态变化的可视化观察.

于晓强课题组^[14~18]设计合成了一系列检测RNA的双光子有机小分子荧光探针. 该课题组以咪唑为荧光母核, 设计合成了检测细胞核和胞质内的RNA探针1~2(图4). 其中, 探针2在固体状态发出强烈的红光. 随着水含量的增加, 其在水和N,N-二甲基甲酰胺混合溶液中, 最大吸收波长逐渐蓝移. 在水含量为90%时, 利用动态光散射仪和透射电镜测试发现, 聚集体的粒径分布为70~100 nm, 同时可以清楚地观察到探针2的球形形态. 这些数据表明, 探针2具有聚集诱导发光的特性. 探针2表现出比商业RNA探针SYTO更好的光稳定

图2 检测核酸的有机小分子荧光探针的发展

Figure 2 Development of the small-molecule fluorescent probes for detecting nucleic acids

图3 检测核糖核酸的有机小分子荧光探针的主要应用

Figure 3 Main applications of the small-molecule fluorescent probes for detecting RNA

性和灵敏性。紧接着,他们基于吡啶衍生物发色团合成了可用于检测RNA的探针3a~3d和4a~4b(图4)。此外,他们分别以吡啶衍生物为吸电子基团和苯并噻唑碘盐为吸电子基团设计合成了探针5a~5b(图4)。这两个探针表现出优良的光稳定性,较低的细胞毒性和较强细胞膜穿透能力。探针3a~3d表现出与经典DAPI染料良好的反染相容性。探针4a~4b和探针5a~5b表现出与Hoechst 33342良好的反染相容性。利用探针1~5,实现了细胞核和胞质内RNA的双光子荧光成像。

林伟英课题组^[19]基于吡咯盐吸电子基团设计合成了检测线粒体RNA(mitochondrial RNA, mtRNA)的探针6(图4)。探针6具有高度的选择性、低毒性和良好

的细胞通透性。而且,探针6比商业探针SYTO光稳定性更强,可被用于肿瘤细胞和吞噬细胞中mtRNA的实时成像。另外,他们课题组^[20]以4-氨基苯为供电子基团和噻啉盐为吸电子基团设计了动态检测RNA的探针7a~7c(图4)。因为探针7c与RNA有较强的结合力,在线粒体膜电位降低时,探针7c能从线粒体释放进入细胞核。他们利用探针7c实现了由紫杉醇、秋水仙碱、鱼藤酮和紫外线照射诱导细胞凋亡引起线粒体膜电位变化的可视化成像。

Devaraj课题组^[21]为了减少探针与信使RNA(messenger RNA, mRNA)的非特异性结合,在噻唑橙结构上引入较大的取代基,设计并合成了一系列检测mRNA的探针8a~8i(图4)。其中,探针8i与mRNA结合后荧光强度增强了100倍。共聚焦成像实验表明,探针8i能以免清洗的方式在中国仓鼠卵巢细胞中结合mRNA。

周虹屏课题组^[22]报道了基于苯乙烯基吡啶盐骨架的双光子荧光探针9(图4),此探针可用于动态监测自噬过程中的细胞核、线粒体和含溶酶体的线粒体。圆二光谱和核磁滴定实验证明,探针9通过氢键、 π - π 堆积和电荷-电荷相互作用结合RNA从而“点亮”探针9。探针9具有较大的双光子截面、良好的水溶性和生物相容性。利用此探针的双光子性质,实现了监测自噬过程中多细胞器动态变化的过程。

Jaschke课题组^[23]报道了以硅罗丹明为荧光团结合RNA适配体的远红外荧光探针10(图5)。探针10的荧光量子产率为0.98,摩尔消光系数为 $8600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 。借助探针10可以观察到免洗活细胞系统中细菌表达的mRNA。同时,利用受激发射损耗超分辨显微图像,可以观察到探针10结合在活细胞中的mRNA上。

黄志舒课题组^[24]设计合成了以苯并噻唑-吡啶为骨架检测RNA G-四链体的探针11a~11d(图5)。其中,结构中包含延伸的芳香环和以G-四链体以及磷酸为靶向的氨基侧链11c,其对识别G-四链体具有高度的专一性、亲合力和灵敏性。11c能在活细胞和固定细胞中用于RNA G-四链体的成像,而且可用于观察活HeLa细胞中RNA G-四链体的运动状态。

同样基于苯并噻唑为荧光母核,田玉鹏课题组^[25]设计了检测RNA的双光子探针12(图5)。在活细胞中,探针12在低浓度时,主要富集在线粒体;浓度较高时,探针12从线粒体释放进入细胞核。然而,在固定细胞

图 4 检测核糖核酸的有机小分子荧光探针1~9

Figure 4 Small-molecule fluorescent probes (1–9) for detecting ribonucleic acid

图 5 检测核糖核酸的有机小分子荧光探针10~14

Figure 5 Small-molecule fluorescent probes (10–14) for detecting ribonucleic acid

中, 在低浓度和高浓度时, 探针 12 都定位于细胞核中。而且在由顺铂和佛波醇-12-肉豆蔻酸-13-乙酸酯诱导的凋亡实验中, 因为细胞核膜通透性的增加, 探针 12 (低浓度时)更倾向于结合细胞核内的RNA。另外, 该课题组^[26]基于锌(II)三吡啶基硝酸盐络合物合成了同样可以检测细胞活力的探针 13 (图5)。利用双光子成像技术, 探针 13 在活细胞中定位在线粒体, 在凋亡细胞中探针 13 从线粒体释放进入细胞核中。因此, 探针 12 和 13 都可以用于检测细胞活力。

史海斌课题组^[27]以Cyanine 7为荧光母核设计合成了能与胞内RNA共价交联并且具有治疗功能的探针 14 (图5)。在探针 14 中, 环状(精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸)(cyclic arginine-glycine-aspartic acid, cRGD)肽作为肿瘤细胞的靶向基团。另外, 对单线态氧敏感的呋喃基团作为与胞内RNA交联的基团。该探针具有近红外和光声信号双模态成像的特点。他们的研究表明, 该探针中的呋喃基团与胞内RNA的结合有利于抑制探针的胞吐作用, 因此能增加其在肿瘤内的积聚和滞留。同

时, 他们认为这种共价结合会诱导癌细胞的凋亡, 而且会明显抑制肿瘤细胞的生长. 探针**14**为肿瘤的抑制和治疗提供了新的思路.

3 检测脱氧核糖核酸的有机小分子荧光探针

与检测核糖核酸的有机小分子荧光探针相比, 识别脱氧核糖核酸的有机小分子荧光探针在生物应用上更加广泛, 这类探针从体外逐渐发展到活体检测的水平(图6), 例如实现了斑马鱼体内DNA的可视化成像.

Isaindigotone是一种天然生物碱, 广泛存在于中国传统药材中. 黄志纾课题组^[28,29]研究发现, Isaindigotone的衍生物对于G-四链体有较高的结合力和选择性. 该课题组^[30,31]以天然产物Isaindigotone为G-四链体核酸的配体, 设计合成了检测G-四链体的两种比色型红光荧光探针**15**和**16**(图7). 这两种探针中分别将Isaindigotone结合噻唑橙和香豆素-半花菁作为荧光骨架. 探针**15**在与G-四链体结合前最大吸收波长为535 nm, 此时以H-聚集体的形式存在. 然后与G-四链体结合后, 在535 nm处的吸收峰随着加入的G-四链体的浓度增加而逐渐降低, 同时新出现的600 nm处的吸收峰伴随着G-四链体的浓度增加而逐渐升高, 此时探针**15**主要以单体形式存在. 他们证实, 探针**15**是与G-四链体二级结构相互作用, 而不是简单地与富含G的核酸序列相互作用以产生颜色变化. 探针**15**与G-四链体的解离常数 K_d 范围为0.429~0.735 $\mu\text{mol/L}$, 对于单链和双链核酸没有特殊反应. 这表明探针**15**能用来区分G-四链体和非四链体. 比色型探针**16**未与G-四链体结合时在535 nm有最大吸收峰, 在与G-四链体结合后, 在600 nm处出现新的吸收峰. 同时, 探针**16**在653 nm无荧光, 用紫外灯照射含有探针的磷酸盐缓存溶液(phosphate buffer saline, PBS)为无色. 在加入G-四链体后, 653 nm处的荧光强度逐渐增强, 此时用紫外灯照射含有探针的PBS溶液为浅红色, 因此可以用肉眼观察“开-关”型的探针**16**与G-四链体的结合. 共聚焦成像和染色质免疫沉淀结果表明, 探针**16**结合核糖体中的G-四链体.

同时, 黄志纾课题组^[32-35]以三芳基咪唑为G-四链体配体设计合成了一系列检测G-四链体的有机小分子荧光探针**17~20**(图7). 探针**17**与G-四链体具有较强结合力和较高的稳定性, 该探针对于端粒G-四链体DNA

图6 检测脱氧核糖核酸的有机小分子荧光探针的主要应用

Figure 6 Main applications of the small-molecule fluorescent probes for detecting DNA

的选择性是双链体DNA的8.7倍. 探针**18**能够应用于检测平行结构的G-四链体. 而且探针**18**在检测G-四链体样品时不会改变G-四链体的拓扑结构和热稳定性. 他们进一步的研究表明, 探针**18**“开-关”型的响应是通过末端堆积与更暴露的平行G-四链体紧密结合导致其旋转状态进一步受限引起的. 和探针**17**和**18**一样, 探针**19**也表现出比色型的特点, 但探针**19**的最大发射波长为525 nm. 值得注意的是, 探针**19**的检测限仅为5 ng. 紧接着, 黄志纾课题组通过化学点击反应合成了探针**20**, 为设计合成检测G-四链体的有机小分子荧光分子探针提供了新的思路. 与探针**19**相比, 探针**20**的检测限为10 nmol/L. 荧光探针**17~20**的最大发射波长都在525 nm左右, 较短的发射波长限制了此类探针的进一步应用.

Teulade-Fichou课题组^[36,37]以三苯胺为荧光母核合成了一系列检测DNA的双光子探针**21~25**(图7). 他们利用圆二色谱实验证明探针**21~25**结合在DNA的小沟中. 探针**21**和**25**表现出良好的光稳定性, 可以用来观察CHO-K1细胞的有丝分裂过程. 而且它们的双光子激发波长为820 nm. 探针**22**和**25**的双光子吸收截面均为700 GM, 高于荧光素(大约40 GM)和罗丹明B(大约100 GM). 因此, 他们的研究表明三苯胺可作为优异的双光子荧光染料的母核.

由于其良好的生物活性, 近年来带有稠合芳香族的咪唑骨架越来越受到关注^[38], 而且人工合成或天然的该类化合物的衍生物已经广泛用于荧光探针和抗肿瘤药物的设计合成中^[39-41]. 以咪唑为荧光母核, Chang等人^[42-44]设计合成了特异性结合G-四链体d(T2AG3)4的有机小分子荧光探针**26**(图7). 在双光子激发荧光寿命成像中, 他们不仅证明了人端粒中反平行G-四链体结构的存在, 而且通过荧光成像发现了其在有丝分裂

图 7 检测脱氧核糖核酸的有机小分子荧光探针15~31

Figure 7 Small-molecule fluorescent probes (15–31) for detecting deoxyribonucleic acid

中期染色体中的定位。

利用双光子成像技术, Wong课题组^[45]基于咪唑-双花菁生色团设计合成了检测双链脱氧核糖核酸的探针27(图7), 该探针能选择性结合在富含AT序列的区域。在双光子800 nm的激发下, 探针27在573 nm处荧光较弱, 在与DNA结合后, 在573 nm处荧光强度增强了77倍, 同时荧光量子产率从0.003增加到0.13, 因此该探针具备检测DNA的良好性质。该课题组结合荧光滴定实验和质粒DNA解卷法证明探针27结合在DNA的小沟中。而且探针27成功应用于双光子检测HeLa细胞中的DNA。同样, 段宣明课题组^[46]基于咪唑骨架合成了一系列检测DNA的有机小分子荧光探针。其中探针28(图7)非刚性亚甲基桥连接两个乙烯基吡啶咪唑结构。探针28具备优良的特性, 如201 nm的斯托克斯位移, 较大的双光子界面和较低的细胞毒性。此外, 探针28在与DNA结合后, 荧光强度增强了30倍。

圆二色谱实验表明, 连接非固定的双阳离子基团的探针28能与多种DNA结构特异结合。与探针27不同的是, 探针28在活HeLa细胞中结合在线粒体, 在固定的HeLa细胞中结合在核内的DNA中。于晓强课题组^[47,48]基于咪唑荧光团设计了一系列可用于检测DNA的探针29和30。其中探针29(图7)能用于检测拟南芥根部和叶片的DNA。与碘化乙锭相比, 探针29具有较大的双光子界面和较大的荧光量子产率以及较深的成像深度。探针30(图7)可用于检测线粒体膜电位。探针29和探针30与DNA的结合常数(K)分别为 6.46×10^6 和 $8.30 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ 。当线粒体膜电位正常时, 该探针位于线粒体, 然而当线粒体膜电位下降时, 该探针从线粒体转移到核中。与探针29一样, 探针30可以用于鉴别死细胞和活细胞。

彭孝军课题组^[49]在商业细胞核染料TO-3结构上引入(二氨基)丁基取代基设计合成了检测DNA的探

针**31**(图7). 探针**31**对DNA具有高度的选择性, 在与DNA结合后, 探针**31**在649 nm处的荧光强度增加了97.3倍, 是与RNA结合后在649 nm处的荧光强度的6倍. 圆二色谱实验表明, 探针**31**结合在DNA的小沟处. 而且通过细胞流式实验证明, 探针**31**检测DNA的灵敏性比商业染料PI更强. 共聚焦成像证明, 该探针能够实现活细胞和固定细胞中细胞核内DNA的成像.

林伟英课题组^[50]结合商业染料Hoechst 33342和PIC-1的结构, 开发了以阳离子喹啉结构为吸电子基团的能动态监测细胞活力的探针**32**(图8). 该探针在正常细胞的线粒体中聚集, 并发出红光; 在细胞活力降低时, 探针**32**从线粒体中释放结合细胞核内的DNA, 此时形成单体, 并发出绿光; 当细胞活力恢复时, 探针**32**又能从细胞核内返回到线粒体中, 并发出红光. 由鱼藤酮引起的细胞凋亡以及VC阻止鱼藤酮引起的细胞凋亡过程, 都能利用该探针检测到. 因此, 借助荧光共聚焦成像, 他们利用探针**32**实现了细胞活力的动态可视化监测. 同时, 该探针能动态监测线粒体膜电位的变化.

另外, 林伟英课题组^[51]报道了以苯并噻唑为荧光母核可检测活体DNA的探针**33**(图8). 在探针**33**中, 吡啶盐作为吸电子基团, 同时因为吡啶盐所带的阳离子可以定位于线粒体. 探针**33**具有较大的斯托克斯位移和荧光量子产率. 在细胞成像实验中, 他们利用探针**33**首次显示了线粒体网状结构在细胞质中的分布. 而且他们利用双光子成像, 首次实现了在组织中检测DNA. 同时, 也实现了在斑马鱼中检测DNA的可视化成像.

瞿金清课题组^[52]以9,9-二甲基-芴为荧光母核合成了检测核酸的探针**34**(图8). 探针**34**在体外与DNA结合后, 荧光量子产率增加了6.4倍. 体外荧光滴定实验表明, 相比于RNA, 探针**34**对DNA具有更强的结合力. 然而, DNA和RNA消化酶实验表明, 探针**34**在细胞中对RNA具有更强的结合力. 该探针表现出比DAPI更优越的光稳定性.

韩守法课题组^[53]结合商业染料SYBR Green-I(SG)和阳离子罗丹明B设计了双通道检测DNA的探针**35**(图8). 在探针**35**中, SG结合双链DNA时发出绿光, 罗丹明B则因其正电荷能定位于线粒体中. 共聚焦成像实验中, 探针**35**的浓度较低时, 主要分布在线粒体中; 浓度较高时, 部分探针**35**会进入到细胞核内与细胞核

内的DNA结合. 他们的实验进一步证明, 这种动态转移与线粒体膜电位有关, 同时他们也证明相比于细胞核DNA, 探针**35**结合线粒体DNA的能力更强. 另外, 他们利用探针**35**证明, 在HeLa细胞中抗癌药物阿霉素会引起线粒体DNA聚集和导致线粒体自噬的加剧.

Johnsson课题组^[54]将Hoechst 33342耦合羧基化硅罗丹明设计合成了一种新的检测DNA的探针**36**(图8). 该探针具备远红外的激发波长和发射波长, 生物相容性好, 对DNA具有很强的专一性等优点. 利用共焦激光扫描三维延时显微镜, 他们实现了活细胞分裂的动态观察.

Ihmels课题组^[55]基于8-苯乙烯基取代珊瑚烯衍生物设计合成了一些列检测四链体DNA的探针**37a~37g**(图8). 通过光度和荧光滴定实验以及荧光变性实验表明, 探针**37a~37d**与DNA的结合比不同. 其中, 探针**37b**最大发射波长在480 nm, 向含有探针**37b**的缓冲液中逐渐加入ctDNA和G4 DNA时, 480 nm处的荧光强度逐渐减低, 新出现的695 nm处的荧光强度逐渐增强. 利用落射荧光显微镜和共聚焦显微成像, 他们借助探针**37b**实现了NIH 3T3小鼠成纤维细胞中DNA的可视化成像.

唐本忠课题组^[56]以吡啶鎓修饰的四苯乙烯为荧光骨架设计合成了具有聚集诱导效应的检测线粒体DNA的探针**38**(图8). 通过研磨和发烟处理, 可以使探针**38**的荧光发射在结晶态的黄绿色和非晶态的红橙色之间切换. 探针**38**显示出典型的聚集诱导增强效应、溶剂化效应和机械化变色的特点. 同时由于其良好的细胞通透性和较低的细胞毒性, 探针**38**成功用于线粒体DNA的成像.

Barton课题组^[57~59]设计了以钆配合物为DNA识别基团的可识别错误配对的DNA探针**39~40**和以铈配合物为DNA识别基团的可识别错误配对的DNA探针**41**(图8). 探针**39**与错误配对DNA结合时的荧光强度比正确配对DNA的荧光强度高26倍. 前者的激发态发射寿命为160 ns, 而后者为35 ns. 结合 $\text{Cu}(\text{phen})_2^{2+}$ 淬灭实验, 证明探针**39**以金属离子插入DNA小沟的模式与DNA结合. 相比于探针**39**, 连接空间体积较大芳香族配体的探针**40**与错误配对DNA结合时的荧光强度比与正确配对DNA结合时高500倍. 当在溶液中游离或与配对正确的DNA结合时, 探针**41**发出微弱的荧光, 但在含有中心CC错配的27聚体DNA双链体存在时, 则发出

图 8 检测脱氧核糖核酸的有机小分子荧光探针32~41

Figure 8 Small-molecule fluorescent probes (32–41) for detecting deoxyribonucleic acid

明亮的荧光. 与探针39和40不同, 探针41将阳离子吡啶三甲基花青(Cy3)作为荧光输出基团, 增大了激发波长. 探针39和40的激发波长均为440 nm, 而探针41的激发波长为520 nm. 他们的实验证明, 探针40与探针39一样也是以金属插入DNA的方式与DNA结合, 而探针41是以DNA小沟结合和嵌入两种方式. 他们通过DNA光裂解实验证明探针41能特异性靶向错误配对的DNA. 同时利用荧光滴定实验, 进一步证明探针41能区分基因修复缺陷和正常的基因组. 该课题组的研究成果在疾病诊断方面做出了前瞻性的工作, 但遗憾的是没有在细胞水平和特异性的疾病方面深入探究.

4 检测核糖核酸和其他生物分子的有机小分子荧光探针

同时检测核糖核酸和其他生物分子的有机小分子荧光探针在应用上极大地扩大了识别核酸的荧光探针的生物应用(图9). 此类新型荧光探针, 即多功能探针, 能够监测具体某一生理或者病理条件下的两个目标分子的动态变化, 为揭示生物体的生理过程和病理特征提供具有巨大潜力的工具.

杨国强课题组^[60–62]以三芳基硼为荧光母核合成

图 9 检测核糖核酸和其他小分子的有机小分子荧光探针的主要应用

Figure 9 Main applications of the small-molecule fluorescent probes for detecting DNA and other biomolecules

了一系列可用于检测RNA和其他功能的多功能探针42a~42h(图10). 双光子探针42a~42f可以检测核仁中的RNA以及极性. 比色型探针42b和42d表现出良好的细胞通透性, 并且用肉眼可观察到RNA与探针的反应变化. 而且42d能进一步应用于NIH/3T3细胞中核仁、核膜和核基质的成像. 由于 Zn^{2+} 离子中心能特异性结合聚磷酸核苷和RNA的磷酸侧链, 所以探针42g和42h能用于检测聚磷酸核苷和RNA. 探针42h因其良好的两性特点, 表现出比42g更好的细胞通透性. 多功能探针42h能成功用于细胞膜、内质网和核仁的成像.

图 10 检测核糖核酸和其他小分子的有机小分子荧光探针42~48

Figure 10 Small-molecule fluorescent probes (42–48) for detecting ribonucleic acid and other biomolecules

林伟英课题组^[63,64]以吡啶和吡啶盐分别为荧光母核合成了多功能探针43和44(图10)。探针43能同时检测RNA和硫化氢, 探针44能同时检测RNA和二氧化硫。这两个探针都以插入的方式与RNA结合, 从而“点亮”两个探针并分别发出红光和绿光。硫化氢亲核进攻探针43结构中的吡啶C-2原子, 导致共轭架构破坏, 从而减低分子内电荷转移效率, 最终引起发射光蓝移。利用双光子探针43实现了在肿瘤细胞、斑马鱼和小鼠体内同时检测硫化氢和RNA的可视化荧光成像。与探针43一样, 探针44也具有高度的选择性和灵敏性特点, 其检测二氧化硫的检测限为0.2 $\mu\text{mol/L}$ 。探针44可用于检测细胞、组织、斑马鱼和小鼠活体中的二氧化硫。探针43和44都可用来区分正常小鼠和肿瘤小鼠。分别利用7-羟基香豆素和喹啉衍生物作为pH和RNA的响应基团, 他们课题组^[65]设计了可同时检测细胞内pH和RNA的多功能探针45(图10)。在405 nm激发时, 随着

pH的升高, 探针45在460 nm处的荧光强度逐渐增强。另外, 在561 nm激发时, 随着RNA浓度的增加, 探针45在625 nm处的荧光强度逐渐增强。在正常细胞中, 探针45定位于线粒体, 发出蓝光和红光; 在由鱼藤酮和紫杉醇诱导的凋亡细胞中, 探针45从线粒体游离出来结合细胞核内的RNA, 仅发出红光, 从而实现对细胞凋亡的可视化监测。同时, 由过氧化氢引起的氧损伤也实现监测。

周虹屏课题组^[66]报道了以吡啶盐-苯二甲胺基为骨架的可用于检测RNA和光动力治疗的多功能探针46(图10)。此探针具有聚集诱导效应的特性。他们的实验证明经光照后, 探针46产生大量的单线态氧, 并且引起线粒体自噬。另外, 他们的实验表明, 在异常的线粒体引起细胞死亡之前, 线粒体自噬有效清除了异常的线粒体。而且随着线粒体损伤加剧, 细胞凋亡占主导地位, 探针46逐渐转移到核仁中。他们的实验为研究

细胞活力控制提供了简单、方便的工具, 同时为光动力治疗的研究提供了新的思路.

宋大千课题组^[67]设计了一种以苯并噻唑为荧光母核的检测RNA和半胱氨酸的多功能近红外探针**47**(图10). 在此探针中, 烯丙基酰氯作为半胱氨酸的反应基团. 探针**47**具有较快的反应时间、良好的专一性和灵敏性等特点. 探针**47**能够检测线粒体中的半胱氨酸, 与半胱氨酸反应后的反应产物能进入核仁与RNA结合发出强烈的红色荧光. 利用该探针, 实现了HeLa细胞中内源性半胱氨酸的检测, 同时为核仁的定位提供了新的方法.

Tse课题组^[68]通过较短的聚乙二醇链连接二溴荧光素和Hoechst染料设计合成了结合染色质RNA和蛋白的多功能探针**48**(图10). 他们没有利用外源蛋白质, 而是通过探针**48**结合细胞核内dsDNA的小沟以实现RNA和蛋白质的空间受限标记. 在没有光照的时候, 探针**48**分布在整个细胞; 在光照后, 探针**48**主要分布在细胞核内. 细胞分级分离和蛋白质印迹实验表明, 胞浆蛋白(GAPDH), 核仁蛋白(nucleolin)和线粒体外膜蛋白(TOM20)未富集. 骨架蛋白(α -微管蛋白)略微富集, 表明其中一些蛋白与dsDNA相互作用. 在异质核糖蛋白(heterogeneous nuclear ribonucleoprotein, hnRNPs)中, 除hnRNP K外, 其他蛋白大多富集. 同时, 实时荧光定量聚合酶链反应实验表明, 与染色质相关的RNA高度富集. 他们的研究为定位染色质RNA和蛋白提供了新的思路和方法.

5 检测脱氧核糖核酸和其他生物分子的有机小分子荧光探针

在生物成像上, 与其他类探针相比, 监测脱氧核糖核酸和其他生物分子的有机小分子荧光探针开始结合兴起的超高分辨成像技术(图11). 同时该类探针与检测核糖核酸和其他生物分子的有机小分子荧光探针一样, 可以结合该类探针自身的优势, 监控两个生物分子之间的交互关系和动态变化, 因此可以解释生理现象以及阐述发病机制.

邵勇课题组^[69]报道了以苯并噻唑-二甲基氨基苯基为荧光母核的检测G-四链体和钾离子的多功能探针**49**(图12). 探针**49**可用于检测G-四链体混合结构和其他结构之间的转换. 同时, 探针**49**对钾离子具有高

图 11 检测脱氧核糖核酸和其他小分子的有机小分子荧光探针的主要应用

Figure 11 Main applications of the small-molecule fluorescent probes for detecting RNA and other biomolecules

度的选择性和专一性, 在100 mmol/L钠离子的存在下, 对钾离子的检测限为1 mmol/L.

易涛课题组^[70]设计合成了以苯乙烯基和萘二甲酸酐为发色团的可检测线粒体内部过氧化氢的比率型探针**50**(图12). 两个发色团由两条Trp-Thr-Lys三肽连接, 这两条三肽的C端由赖氨酸连接. 在探针**50**中, 这两条三肽结合在DNA的小沟中, 一旦结合, 由于DNA小沟中的极性较低, 因而苯乙烯基发出较强红光. 另一方面, 苯硼酸作为过氧化氢的反应基团, 在与过氧化氢反应后发出绿光, 从而实现DNA与过氧化氢的同步检测. 利用探针**50**, 实现了HeLa细胞线粒体周围内源性和外源性过氧化氢的检测.

周虹屏课题组^[71]报道了两种以苯并噻唑为吸电子基团的双光子比率型水溶性探针**51**和**52**(图12). 探针**51**可以与核仁内DNA结合, 同时可以检测核内黏度. 探针**52**结合核仁和胞质内RNA, 同时可检测胞质黏度. 这两个探针都可以用于活细胞和组织内黏度的检测.

Shaikh课题组^[72]报道了一种多功能塞伦配体探针**53**及其 Al^{3+} 配合物**53a**(图12). 探针**53**可用于检测DU145细胞和MCF-7细胞中内源性的 Al^{3+} . 他们的实验证明, **53a**分别与细胞核及核仁中的DNA和RNA结合.

Thomas课题组^[73]报道了基于双核钌配合物的多模态成像探针**54**(图12). 该近红外探针具有极出色的光稳定性、较大的斯托克斯位移和突出的亚细胞器定位功能. 在浓度较低时, 探针**54**位于线粒体; 浓度较高时, 过量的探针**54**会与细胞核内的DNA结合. 利用激光共聚焦荧光成像技术, 该探针实现了活细胞和固定细胞核内DNA结构的可视化成像. 而且该探针与DNA结合后具有较长的荧光寿命, 此探针还被用于结构光照明显微成像和超高分辨率成像以及3D-超高分辨率成像.

图 12 检测脱氧核糖核酸和其他小分子的有机小分子荧光探针49~61

Figure 12 Small-molecule fluorescent probes (49–61) for detecting deoxyribonucleic acid and other biomolecules

毛宗万课题组^[74]以花菁染料为荧光母核设计合成了两种可以动态监测核仁和染色质的双光子探针**55**和**56**(图12)。探针**55**和**56**具有良好的细胞通透性、较低的毒性、较高的信号噪比、较大的斯托克斯位移、相对较好的光稳定性和选择性等优点。借助共聚焦显微成像, 探针**55**和**56**可用于实时监测细胞周期中核仁和染色质的动态变化。通过乙烯基将二吡啶基三苯胺和苯并噻唑盐连接, 他们课题组^[75]合成了检测二氧化硫和DNA的多功能探针**57**(图12)。在515 nm激发时, 探针**57**在735 nm处的发射波长随着亚硫酸氢根的加入逐渐减弱。然而, 在含有DNA的缓冲液中, 在515 nm激发时, 探针**57**的最大发射波长为665 nm, 同样随着亚硫酸氢根的加入逐渐减弱。同时, 在405 nm的激发下, 出现了位于565 nm的新发射峰, 并且荧光强度随着亚硫酸氢根的加入逐渐增大。在PBS缓冲液和含有DNA的缓冲溶液中, 探针**57**对二氧化硫的检测限分别为25.4和320 nmol/L。利用该探针, 他们首次实现了体内和体外细胞核内二氧化硫的可视化成像。

范哲峰课题组^[76]设计了一种检测锌离子的金属配合物探针**58**(图12)。该探针表现出聚集诱导增强的

性质, 而且具有极高的灵敏性和专一性, 检测限为3.8 nmol/L。探针**58**与DNA结合后, 荧光强度增强了100倍。探针**58**与锌离子结合后的配合物能用来实现细胞内的DNA可视化成像。

王瑞兵课题组^[77]以三苯胺衍生物为荧光母核, 设计合成了能检测细胞核内G-四链体DNA和黏度的双光子探针**59**(图12)。在纯甘油中, 探针**59**在650 nm处的荧光强度是在纯水中的250倍。探针**59**与细胞核染料的重叠系数为0.97, 证明该探针主要定位于细胞核。荧光滴定实验和电泳实验证明探针**59**对于GQ DNA具有较高的选择性。在与telo24 DNA结合后, 探针**59**的荧光强度增强了27倍, 同时结合常数为 $5.26 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ 。利用该探针, 他们成功实现了细胞核成像和黏度变化的检测。

Chatterjee课题组^[78]以四苯基乙烯衍生物为荧光母核设计合成了连续性检测 Al^{3+} 和 F^- /DNA的多功能探针**60**(图12)。探针**60**自身在468 nm荧光较弱, 与 Al^{3+} 结合后在468 nm的荧光逐渐增强, 结合后的产物与四丁基氟化铵或ctDNA反应后, 在468 nm处的荧光强度逐渐减弱。而且该探针具有聚集诱导增强的特点, 他们利用探针**60**实现了HK细胞外源性 Al^{3+} 的检测。

朱海亮课题组^[79]以苯并噻唑为荧光母核合成了可连续检测硫化氢和DNA的多功能探针**61**(图12). 探针**61**可被硫化氢有效激活形成H-型的聚集体, 该聚集体发出绿色荧光; 然后, H-型的聚集体与mtDNA结合形成单体并发出红光. 利用该探针, 他们实现了检测活细胞中内源性和外源性的硫化氢. 而且利用小动物活体成像技术, 他们进一步实现了在小鼠脑部监测由胱硫醚酶激活剂S-腺苷-L-蛋氨酸促进的内源性硫化氢的上调.

6 检测核糖核酸和脱氧核糖核酸的有机小分子荧光探针

可以同时检测RNA和DNA的有机小分子荧光探针有一部分未能区分二者, 因此在实际应用中受到了限制. 另外报道的一些探针可以通过荧光信号正确区分DNA和RNA, 能应用于监控细胞的生命活动, 例如, 实现溶酶体和线粒体之间动态变化的可视化成像(图13).

毛宗万课题组^[80]报道了以阳离子苯并噻唑盐为荧光母核用于检测DNA和RNA的探针**62**和**63**(图14). 探针**62**和**63**在稀溶液中以单体形式存在, 在与核酸结合后发出绿光; 在高浓度时形成聚集体, 同时发出红光. 在细胞共聚焦成像实验中, 探针**62**和**63**都能进入细胞核并发出绿光. 探针**62**能选择性地聚集在溶酶体中并发出红光, 而探针**63**则能进入线粒体并发出红光. 通过绿色和红色的双通道, 这两个探针能分别应用于溶酶体和线粒体生理状态的监测.

彭孝军课题组^[81]在商业染料TO-3的三甲酰链上引入腈基基团, 设计合成了检测核酸的探针**64**(图14). 该探针显示出比商业染料TO-3更强的光稳定性和较大的斯托克斯位移. 而且该探针细胞毒性低并具有较高的荧光量子产率, 成功应用于细胞核和胞质内的核酸荧光成像.

张忠平课题组^[82]报道了以阳离子噻啉衍生物为荧光母核检测过氧化氢、核酸和线粒体蛋白的多功能探针**65**(图14). 在405 nm激发下, 探针**65**在580 nm处的荧光强度随过氧化氢浓度的增加而增强; 在530 nm激发下, 探针**65**在632 nm处的荧光强度随牛血清白蛋白的浓度增加而增强; 在580 nm激发下, 探针**65**在688 nm处的荧光强度随牛血清白蛋白的浓度增加而增

图13 检测核糖核酸和脱氧核糖核酸的有机小分子荧光探针的主要应用

Figure 13 Main applications of the small-molecule fluorescent probes for detecting DNA and RNA

强. 该探针对于过氧化氢、白蛋白和核酸具有良好的选择性, 而且被用来动态监测线粒体核蛋白的变化. 他们利用受激发射损耗成像证明, 线粒体蛋白质定位于线粒体嵴的位置, 并与核酸大量融合形成核蛋白, 而过氧化氢的含量增加会导致核酸-蛋白质复合物的解离.

同样以噻啉衍生物为荧光母核, 田玉鹏课题组^[83]设计合成了三种具有三光子吸收功能、能特异性结合DNA和RNA的探针**66**~**68**(图14). 其中探针**68**检测DNA和RNA的三光子吸收截面分别为 1.03×10^{-80} 和 $1.23 \times 10^{-80} \text{ cm}^6 \text{ s}^2 \text{ photon}^{-2}$. 探针**68**能在活细胞和固定细胞中同时定位于线粒体和细胞核, 该探针可用于细胞核的3D-受激发射损耗成像.

葛健峰课题组^[84]报道了以腺嘌呤-香豆素衍生物为荧光基团可检测DNA和RNA的探针**69**(图14). 该探针在体外对DNA和RNA具有良好的选择性、光稳定性强和毒性低等特点. 因其结构中引入腺嘌呤的基团, 该探针可用于HeLa细胞中线粒体DNA的成像.

7 展望

核酸在有机体的生长、发育和繁殖过程中发挥着十分重要的作用. 同时, 荧光成像技术因其灵敏度高、实时响应、高时空分辨率和非侵入性等特性引起了极大关注. 特别是近年来发展的双光子和近红外成像技术能减少光子散射, 降低组织吸收和组织的自发荧光, 从而进一步提高了荧光成像的对比度和组织深度, 并且可以高灵敏度、高分辨率和实时无创的方法原位观察活体内的各种生物过程并监测目标分析物的动态变化. 近年来, 研究人员获得许多检测核酸的有机小分子荧光探针, 例如, 利用线粒体膜电位依赖性的、可从线粒体转移到细胞核的荧光探针检测细胞活力^[85]. 另外, 还发展了许多可同时检测核酸和

图 14 检测核糖核酸和脱氧核糖核酸的有机小分子荧光探针 62~69

Figure 14 Small-molecule fluorescent probes (62–69) for detecting ribonucleic acid and deoxyribonucleic acid

其他生物分子的多功能探针, 以及同时具有识别核酸和治疗功能的探针. 该类型的多功能探针极大地扩大了此前仅识别核酸的单功能探针的应用范围. 虽然识别核酸的有机小分子荧光探针在近十年来得到了较大发展, 但目前这类探针的设计和应用上遇到了巨大的挑战, 例如已报道的此类探针中很少成功应用于活体成像中.

基于识别核酸的有机小分子荧光探针的发展现状, 有以下问题需要解决: (i) 设计合成具有较高光稳定性的荧光母核, 以实现识别核酸的有机小分子荧光探针的长时程可视化观察. (ii) 设计合成具有近红外二区(1000~1700 nm)的荧光母核, 以达到更令人满意的成像深度和对比度, 以及减少生物背景的干扰^[86,87]. 因为目前已报道的文献中, 许多识别核酸的有机小分子荧光探针的吸收和发射在紫外可见光的范围, 不可避免地受到组织中生物分子的吸收和自荧光的干扰. 而且开发具有近红外二区发射的探针, 有利于扩大识别核酸的有机小分子荧光探针在生物活体上的应用.

(iii) 发展多模态成像的识别核酸的分子探针. 例如, 结合光声成像和荧光成像检测核酸, 从而可以从多个信号、多角度提高光学生物成像的准确度和适用性, 避免错误信号导致的误判. (iv) 开发同时检测核酸和其他生物分子的多功能探针, 用以检测特殊疾病模型下, 核酸和其他特定目标生物分子含量的动态变化, 探索核酸和特定生物分子与疾病之间的关系, 为研究疾病的发病机理和生理生化特征提供新的方法和有效信息. (v) 扩大识别核酸的有机小分子荧光探针的生物学应用, 可将此类探针应用于某些特定疾病相关的生物样品的临床测试中, 为疾病的诊断提供帮助. 例如, 大力开发能识别错误配对的核酸有机小分子荧光探针, 从而在分子水平上为疾病的诊断和发病机制的研究提供有利的手段和依据. (vi) 专一靶向生物体器官的检测核酸的探针是目前研究的空白. 因此, 设计新型靶向特殊器官的检测核酸的分子探针十分有必要, 例如, 靶向大脑和肾脏的分子探针, 可为大脑和肾脏疾病的研究和诊断提供新的思路和方法.

参考文献

- 1 Boutorine A S, Novopashina D S, Krasheninina O A, et al. Fluorescent probes for nucleic acid visualization in fixed and live cells. *Molecules*, 2013, 18: 15357–15397
- 2 Ma Y, Yin J, Li G, et al. Simultaneous sensing of nucleic acid and associated cellular components with organic fluorescent chemosensors. *Coord Chem Rev*, 2020, 406: 213144
- 3 Wu L, Liu J, Li P, et al. Two-photon small-molecule fluorescence-based agents for sensing, imaging, and therapy within biological systems.

[Chem Soc Rev](#), 2021, 50: 702–734

- 4 Li J B, Liu H W, Fu T, et al. Recent progress in small-molecule near-IR probes for bioimaging. [Trends Chem](#), 2019, 1: 224–234
- 5 Guo Z, Park S, Yoon J, et al. Recent progress in the development of near-infrared fluorescent probes for bioimaging applications. [Chem Soc Rev](#), 2014, 43: 16–29
- 6 Wu D, Sedgwick A C, Gunnlaugsson T, et al. Fluorescent chemosensors: the past, present and future. [Chem Soc Rev](#), 2017, 46: 7105–7123
- 7 Okamoto A. Next-generation fluorescent nucleic acids probes for microscopic analysis of intracellular nucleic acids. [Appl Microsc](#), 2019, 49: 14
- 8 Würthner F. Aggregation-induced emission (AIE): a historical perspective. [Angew Chem Int Ed](#), 2020, 59: 14192–14196
- 9 Zhang T, Li Y, Zheng Z, et al. *In situ* monitoring apoptosis process by a self-reporting photosensitizer. [J Am Chem Soc](#), 2019, 141: 5612–5616
- 10 Lai H M, Ng W L, Gentleman S M, et al. Chemical probes for visualizing intact animal and human brain tissue. [Cell Chem Biol](#), 2017, 24: 659–672
- 11 Hu J S, Shao C, Wang X, et al. Imaging dynamic peroxynitrite fluxes in epileptic brains with a near-infrared fluorescent probe. [Adv Sci](#), 2019, 6: 1900341
- 12 Ho H A, Boissinot M, Bergeron M G, et al. Colorimetric and fluorometric detection of nucleic acids using cationic polythiophene derivatives. [Angew Chem Int Ed](#), 2002, 41: 1548–1551
- 13 Yuan L, Lin W, Zheng K, et al. Far-red to near infrared analyte-responsive fluorescent probes based on organic fluorophore platforms for fluorescence imaging. [Chem Soc Rev](#), 2013, 42: 622–661
- 14 Liu X, Sun Y, Zhang Y, et al. A 2,7-carbazole-based dicationic salt for fluorescence detection of nucleic acids and two-photon fluorescence imaging of RNA in nucleoli and cytoplasm. [Org Biomol Chem](#), 2011, 9: 3615
- 15 Liu Y, Meng F, He L, et al. Fluorescence behavior of a unique two-photon fluorescent probe in aggregate and solution states and highly sensitive detection of RNA in water solution and living systems. [Chem Commun](#), 2016, 52: 8838–8841
- 16 Song G, Miao F, Sun Y, et al. Fluorescence turn-on probes for intracellular RNA distribution and their imaging in confocal and two-photon fluorescence microscopy. [Sens Actuat B Chem](#), 2012, 173: 329–337
- 17 Liu Y, Zhang W, Sun Y, et al. Two-photon fluorescence imaging of RNA in nucleoli and cytoplasm in living cells based on low molecular weight probes. [Dye Pigment](#), 2014, 103: 191–201
- 18 Feng R, Li L, Li B, et al. Turn-on fluorescent probes that can light up endogenous RNA in nucleoli and cytoplasm of living cells under a two-photon microscope. [RSC Adv](#), 2017, 7: 16730–16736
- 19 Liu Y, Niu J, Wang W, et al. Tracking of mitochondrial endogenous ribonucleic acid in the cancer cells and macrophages using a novel small-molecular fluorescent probe. [Anal Chem](#), 2019, 91: 1715–1718
- 20 Tian M, Sun J, Dong B, et al. Construction of mitochondria-nucleolus shuttling fluorescent probe for the reversible detection of mitochondrial membrane potential. [Sens Actuat B Chem](#), 2019, 292: 16–23
- 21 Zhou C Y, Alexander S C, Devaraj N K. Fluorescent turn-on probes for wash-free mRNA imaging via covalent site-specific enzymatic labeling. [Chem Sci](#), 2017, 8: 7169–7173
- 22 Zhang H, Zhu X, Li H, et al. A RNA-targeted two-photon bioprobe with high selective permeability into nuclear pore complexes for dynamically tracking the autophagy process among multi-organelles. [Anal Chem](#), 2019, 91: 14911–14919
- 23 Wirth R, Gao P, Nienhaus G U, et al. SiRA: a silicon rhodamine-binding aptamer for live-cell super-resolution RNA imaging. [J Am Chem Soc](#), 2019, 141: 7562–7571
- 24 Yu Z Y, Luo W H, Chen X C, et al. Efficient and rational development of a new fluorescent probe specific for RNA G-quadruplex imaging in cells. [Sens Actuat B Chem](#), 2020, 324: 128770
- 25 Zhao Y, Zhang C, Liu J, et al. Dual-channel fluorescent probe bearing two-photon activity for cell viability monitoring. [J Mater Chem B](#), 2019, 7: 3633–3638
- 26 Liu D, Zhang M, Du W, et al. A series of Zn(II) terpyridine-based nitrate complexes as two-photon fluorescent probe for identifying apoptotic and living cells via subcellular immigration. [Inorg Chem](#), 2018, 57: 7676–7683
- 27 Ye S, Cui C, Cheng X, et al. Red light-initiated cross-linking of NIR probes to cytoplasmic RNA: an innovative strategy for prolonged imaging and unexpected tumor suppression. [J Am Chem Soc](#), 2020, 142: 21502–21512
- 28 Hou J Q, Tan J H, Wang X X, et al. Impact of planarity of unfused aromatic molecules on G-quadruplex binding: learning from isaindigotone derivatives. [Org Biomol Chem](#), 2011, 9: 6422–6436

- 29 Tan J H, Ou T M, Hou J Q, et al. Isaindigotone derivatives: a new class of highly selective ligands for telomeric G-quadruplex DNA. *J Med Chem*, 2009, 52: 2825–2835
- 30 Yan J W, Ye W J, Chen S B, et al. Development of a universal colorimetric indicator for G-quadruplex structures by the fusion of thiazole orange and isaindigotone skeleton. *Anal Chem*, 2012, 84: 6288–6292
- 31 Yan J W, Chen S B, Liu H Y, et al. Development of a new colorimetric and red-emitting fluorescent dual probe for G-quadruplex nucleic acids. *Chem Commun*, 2014, 50: 6927–6930
- 32 Chen S B, Tan J H, Ou T M, et al. Pharmacophore-based discovery of triaryl-substituted imidazole as new telomeric G-quadruplex ligand. *Bioorg Med Chem Lett*, 2011, 21: 1004–1009
- 33 Chen S B, Wu W B, Hu M H, et al. Discovery of a new fluorescent light-up probe specific to parallel G-quadruplexes. *Chem Commun*, 2014, 50: 12173–12176
- 34 Hu M H, Chen S B, Guo R J, et al. Development of a highly sensitive fluorescent light-up probe for G-quadruplexes. *Analyst*, 2015, 140: 4616–4625
- 35 Hu M H, Chen X, Chen S B, et al. A new application of click chemistry in situ: Development of fluorescent probe for specific G-quadruplex topology. *Sci Rep*, 2015, 5: 17202
- 36 Allain C, Schmidt F, Lartia R, et al. Vinyl-pyridinium triphenylamines: novel far-red emitters with high photostability and two-photon absorption properties for staining DNA. *Chembiochem*, 2007, 8: 424–433
- 37 Bordeau G, Faurel E, Allain C, et al. New triarylamine-based far-red DNA stainers with high two-photon absorption properties. *Nucleic Acids Symp Ser*, 2008, 52: 155–156
- 38 Knölker H J, Reddy K R. Isolation and synthesis of biologically active carbazole alkaloids. *Chem Rev*, 2002, 102: 4303–4428
- 39 Nozaki K, Takahashi K, Nakano K, et al. The double N-arylation of primary amines: toward multisubstituted carbazoles with unique optical properties. *Angew Chem Int Ed*, 2003, 42: 2051–2053
- 40 Jacquemard U, Routier S, Tatibouët A, et al. Synthesis of diphenylcarbazoles as cytotoxic DNA binding agents. *Org Biomol Chem*, 2004, 2: 1476–1483
- 41 Yoon S, Kim J H, Lee Y J, et al. A novel carbazole derivative, MHY407, sensitizes cancer cells to doxorubicin-, etoposide-, and radiation treatment via DNA damage. *Eur J Pharmacol*, 2012, 697: 24–31
- 42 Chang C C, Wu J Y, Chien C W, et al. A fluorescent carbazole derivative: high sensitivity for quadruplex DNA. *Anal Chem*, 2003, 75: 6177–6183
- 43 Chang C C, Kuo I C, Ling I F, et al. Detection of quadruplex DNA structures in human telomeres by a fluorescent carbazole derivative. *Anal Chem*, 2004, 76: 4490–4494
- 44 Chang C C, Chu J F, Kao F J, et al. Verification of antiparallel G-quadruplex structure in human telomeres by using two-photon excitation fluorescence lifetime imaging microscopy of the 3,6-bis(1-methyl-4-vinylpyridinium)carbazole diiodide molecule. *Anal Chem*, 2006, 78: 2810–2815
- 45 Feng X J, Wu P L, Bolze F, et al. Cyanines as new fluorescent probes for DNA detection and two-photon excited bioimaging. *Org Lett*, 2010, 12: 2194–2197
- 46 Zheng Y C, Zheng M L, Chen S, et al. Biscarbazolylmethane-based cyanine: A two-photon excited fluorescent probe for DNA and selective cell imaging. *J Mater Chem B*, 2014, 2: 2301–2310
- 47 Zhang Y, Wang J, Jia P, et al. Two-photon fluorescence imaging of DNA in living plant turbid tissue with carbazole dicationic salt. *Org Biomol Chem*, 2010, 8: 4582
- 48 Li X, Tian M, Zhang G, et al. Spatially dependent fluorescent probe for detecting different situations of mitochondrial membrane potential conveniently and efficiently. *Anal Chem*, 2017, 89: 3335–3344
- 49 Peng X, Wu T, Fan J, et al. An effective minor groove binder as a red fluorescent marker for live-cell DNA imaging and quantification. *Angew Chem Int Ed*, 2011, 50: 4180–4183
- 50 Tian M, Sun J, Dong B, et al. Dynamically monitoring cell viability in a dual-color mode: construction of an aggregation/monomer-based probe capable of reversible mitochondria-nucleus migration. *Angew Chem Int Ed*, 2018, 57: 16506–16510
- 51 Niu J, Liu Y, Wang W, et al. A novel mitochondria-targetable probe for imaging endogenous deoxyribonucleic acid in biological systems. *J Photochem Photobiol A Chem*, 2019, 378: 57–65

- 52 Deng K, Wang L, Xia Q, et al. A nucleic acid-specific fluorescent probe for nucleolus imaging in living cells. *Talanta*, 2019, 192: 212–219
- 53 Zou X, Shi Y, Zhu R, et al. Organelle-redirected chameleon sensor-enabled live cell imaging of mitochondrial DNA. *Anal Chem*, 2019, 91: 15899–15907
- 54 Lukinavičius G, Blaukopf C, Pershagen E, et al. SiR-Hoechst is a far-red DNA stain for live-cell nanoscopy. *Nat Commun*, 2015, 6: 8497
- 55 Pithan P M, Decker D, Druzhinin S I, et al. 8-Styryl-substituted coralyne derivatives as DNA binding fluorescent probes. *RSC Adv*, 2017, 7: 10660–10667
- 56 Wang Z, Gu Y, Liu J, et al. A novel pyridinium modified tetraphenylethene: AIE-activity, mechanochromism, DNA detection and mitochondrial imaging. *J Mater Chem B*, 2018, 6: 1279–1285
- 57 Boynton A N, Marcélis L, Barton J K. $[\text{Ru}(\text{Me}_4\text{phen})_2\text{dppz}]^{2+}$, a light switch for DNA mismatches. *J Am Chem Soc*, 2016, 138: 5020–5023
- 58 Boynton A N, Marcélis L, McConnell A J, et al. A Ruthenium(II) complex as a luminescent probe for DNA mismatches and abasic sites. *Inorg Chem*, 2017, 56: 8381–8389
- 59 Nano A, Boynton A N, Barton J K. A rhodium-cyanine fluorescent probe: detection and signaling of mismatches in DNA. *J Am Chem Soc*, 2017, 139: 17301–17304
- 60 Liu J, Zhang S, Zhang C, et al. A water-soluble two-photon ratiometric triarylboron probe with nucleolar targeting by preferential RNA binding. *Chem Commun*, 2017, 53: 11476–11479
- 61 Liu J, Li S, Zhang S, et al. Piperazine multi-substituted triarylboron compound as an aqueous soluble fluorescent probe for imaging nucleoli, nuclear matrix and nuclear membrane. *Sens Actuatur B Chem*, 2018, 261: 531–536
- 62 Liu J, Zhang S, Zhu J, et al. A triarylboron-based binuclear Zn(II) complex as a two-photon fluorescent probe for simultaneous multicolor imaging of the cell membrane, endoplasmic reticulum, and nucleolus. *Anal Bioanal Chem*, 2019, 411: 5223–5231
- 63 Liu Y, Niu J, Wang W, et al. Simultaneous imaging of ribonucleic acid and hydrogen sulfide in living systems with distinct fluorescence signals using a single fluorescent probe. *Adv Sci*, 2018, 5: 1700966
- 64 Wang W, Liu Y, Niu J, et al. A single fluorescent probe for imaging ribonucleic acid and sulfur dioxide in living systems and its unique application in tumor and normal cells. *J Mater Chem B*, 2018, 6: 6607–6614
- 65 Tian M, Sun J, Dong B, et al. Unique pH-sensitive RNA binder for ratiometric visualization of cell apoptosis. *Anal Chem*, 2019, 91: 10056–10063
- 66 Zhu X, Liu G, Bu Y, et al. *In situ* monitoring of mitochondria regulating cell viability by the RNA-specific fluorescent photosensitizer. *Anal Chem*, 2020, 92: 10815–10821
- 67 Zhao L, He X, Li D, et al. A novel fluorescent probe for the localization of nucleoli developed via a chain reaction of endogenous cysteine in cells. *J Mater Chem B*, 2020, 8: 7652–7658
- 68 Li L, Liang J, Luo H, et al. A new chemical approach for proximity labelling of chromatin-associated RNAs and proteins with visible light irradiation. *Chem Commun*, 2019, 55: 12340–12343
- 69 Liu L, Shao Y, Peng J, et al. Molecular rotor-based fluorescent probe for selective recognition of hybrid G-quadruplex and as a K^+ sensor. *Anal Chem*, 2014, 86: 1622–1631
- 70 Wen Y, Liu K, Yang H, et al. Mitochondria-directed fluorescent probe for the detection of hydrogen peroxide near mitochondrial DNA. *Anal Chem*, 2015, 87: 10579–10584
- 71 Li D, Tian X, Wang A, et al. Nucleic acid-selective light-up fluorescent biosensors for ratiometric two-photon imaging of the viscosity of live cells and tissues. *Chem Sci*, 2016, 7: 2257–2263
- 72 Saini A K, Sharma V, Mathur P, et al. The development of fluorescence turn-on probe for Al(III) sensing and live cell nucleus-nucleoli staining. *Sci Rep*, 2016, 6: 34807
- 73 Sreedharan S, Gill M R, Garcia E, et al. Multimodal super-resolution optical microscopy using a transition-metal-based probe provides unprecedented capabilities for imaging both nuclear chromatin and mitochondria. *J Am Chem Soc*, 2017, 139: 15907–15913
- 74 Wang K N, Chao X J, Liu B, et al. Red fluorescent probes for real-time imaging of the cell cycle by dynamic monitoring of the nucleolus and chromosome. *Chem Commun*, 2018, 54: 2635–2638
- 75 Wang K N, Cao Q, Liu L Y, et al. Charge-driven tripod somersault on DNA for ratiometric fluorescence imaging of small molecules in the nucleus. *Chem Sci*, 2019, 10: 10053–10064
- 76 Wen X, Wang Q, Fan Z. An active fluorescent probe based on aggregation-induced emission for intracellular bioimaging of Zn^{2+} and tracking of

- interactions with single-stranded DNA. *Anal Chim Acta*, 2018, 1013: 79–86
- 77 Sun W, Cui J X, Ma L L, et al. Imaging nucleus viscosity and G-quadruplex DNA in living cells using a nucleus-targeting two-photon fluorescent probe. *Analyst*, 2018, 143: 5799–5804
- 78 Hiremath S D, Gawas R U, Mascarenhas S C, et al. A water-soluble AIE-gen for organic-solvent-free detection and wash-free imaging of Al^{3+} ions and subsequent sensing of F^- ions and DNA tracking. *New J Chem*, 2019, 43: 5219–5227
- 79 Qi Y L, Chen L L, Guo L, et al. An activatable and switchable nanoaggregate probe for detecting H_2S and its application in mice brains. *Chem Asian J*, 2020, 15: 3551–3557
- 80 Chao X J, Wang K N, Sun L L, et al. Cationic organochalcogen with monomer/excimer emissions for dual-color live cell imaging and cell damage diagnosis. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2018, 10: 13264–13273
- 81 Zhang S, Fan J, Li Z, et al. A bright red fluorescent cyanine dye for live-cell nucleic acid imaging, with high photostability and a large Stokes shift. *J Mater Chem B*, 2014, 2: 2688–2693
- 82 Yang G, Liu Z, Zhang R, et al. A multi-responsive fluorescent probe reveals mitochondrial nucleoprotein dynamics with reactive oxygen species regulation through super-resolution imaging. *Angew Chem Int Ed*, 2020, 59: 16154–16160
- 83 Elhussin I E H, Zhang S, Liu J, et al. A novel water-soluble quinolone-indole derivative as a three-photon fluorescent probe for identifying nucleolus RNA and mitochondrial DNA. *Chem Commun*, 2020, 56: 1859–1862
- 84 Wei Y F, Wang Y, Wei X R, et al. Adenine-based small molecule fluorescent probe for imaging mitochondrial nucleic acid. *Spectrochim Acta Part A Mol Biomol Spectr*, 2020, 229: 117865
- 85 Tian M, Ma Y, Lin W. Fluorescent probes for the visualization of cell viability. *Acc Chem Res*, 2019, 52: 2147–2157
- 86 Kenry, Duan Y, Liu B. Recent advances of optical imaging in the second near-infrared window. *Adv Mater*, 2018, 30: 1802394
- 87 Lei Z, Zhang F. Molecular engineering of NIR-II fluorophores for improved biomedical detection. *Angew Chem Int Ed*, 2021, 60: 16294–16308

Progress in small-molecule fluorescent probes for nucleic acids

QI YaLin, WANG HaiRong, CAO YuYao & ZHU HaiLiang

State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, School of Life Sciences, Nanjing University, Nanjing 210023, China

Nucleic acids (NAs), including deoxyribonucleic acid (DNA) and ribonucleic acid (RNA), are biological macromolecular substances formed through the polymerization of nucleotide monomers. NAs contribute to the growth, development, and reproduction of living organisms. Due to developments in fluorescence-imaging technology, organic small-molecule fluorescent probes have become robust tools for imaging nucleic acid in cells, tissues, and *in vivo*. In this paper, based on the fluorophores, we systematically summarized the recent (2000–2021) progress in the development of organic small-molecule fluorescent probes for detecting NAs. In addition, the design strategies, reaction mechanisms, and biological applications of these fluorescent chemosensors were discussed in this review. Finally, the challenges and prospects of this promising field were discussed.

small-molecule fluorescent probes, nucleic acids, deoxyribonucleic acid, ribonucleic acid, fluorescence imaging

doi: [10.1360/SSV-2021-0269](https://doi.org/10.1360/SSV-2021-0269)