



光激活定位超分辨荧光成像的罗丹明分子设计

叶智伟[†], 杨薇^{†*}, 肖义^{*}

大连理工大学精细化工国家重点实验室, 大连 116024

[†]同等贡献

*通讯作者, E-mail: yw917@dlut.edu.cn; xiaoyi@dlut.edu.cn

收稿日期: 2017-03-09; 接受日期: 2017-04-24; 网络版发表日期: 2017-07-14

国家自然科学基金(编号: 21174022, 21376038, 21421005, 21576040)和国家重点基础研究发展计划(编号: 2013CB733702)资助项目

摘要 光激活定位显微技术(PALM)等超分辨成像技术的发展为高水平生命科学研究提供了突破光学衍射极限的研究工具. 实现超分辨荧光成像的核心要素之一是高性能荧光染料, 而罗丹明染料由于其优良的光学性质已成为设计PALM染料的热门选择. 本文通过对PALM超分辨成像特点分析, 给出PALM罗丹明染料的设计要求, 并对已报道的PALM超分辨罗丹明染料的设计策略及其优缺点进行比较分析, 希望通过对分子设计策略的综述, 为研究者设计PALM超分辨罗丹明染料提供了一些帮助.

关键词 光激活定位显微技术, 超分辨, 罗丹明, 螺内酰亚胺, 笼式罗丹明

1 引言

光激活定位显微技术(PALM)等超分辨荧光成像技术的发展突破了光学衍射极限, 使得光学显微镜应用到微观的研究领域^[1,2]. 目前PALM成像中的两种主要的荧光标记分子分别是荧光蛋白和小分子染料^[3,4]. 然而荧光蛋白种类较少, 并受限于其较差的激活能力, 仅有少数几种荧光蛋白(mEOS3.2、mCherry等)具有PALM超分辨成像能力^[5,6]. 另外, 荧光蛋白的分子体积庞大, 修饰标记的蛋白后, 很有可能会影响标记蛋白的生理功能. 小分子染料本身具有比荧光蛋白更强的发光能力并且部分小分子染料具有更高的光稳定性, 更有利于实现超分辨成像^[7-9]. 小分子染料的另外一个优势是较小的分子体积. 小分子染料标记蛋白等大分子后, 对研究客体的生理功能影响小. 小分子染

料的可拓展性也使得其可以通过分子设计获得不同的波长和不同光学性质的染料^[10-14], 在多色超分辨成像中可以有效弥补荧光蛋白的波长局限性.

在PALM染料设计中最为广泛使用的小分子染料为罗丹明^[10,15-22]. 罗丹明染料具有高荧光量子产率、高吸收截面和很好的光稳定性, 是一种传统的激光染料^[23]. 早在20世纪70年代, Knauer和Gleiter^[24]发现, 罗丹明螺内酰亚胺(rhodamine spirolactam)具有光激活的能力. 在紫外光照射下, 原本闭环无荧光的罗丹明可以可逆地转化为开环具有强荧光发射的双离子盐结构. 2007年, Hell等^[15,16]将这种可逆的转换首先应用在微管蛋白的PALM超分辨成像中, 紧接着他们又改善了罗丹明螺内酰亚胺的水溶性, 并获得了长波长发光的可激活PALM染料. Moerner等^[17]设计了延长激活波长的罗丹明螺内酰亚胺, 并将其应用于活细胞细胞膜

引用格式: 叶智伟, 杨薇, 肖义. 光激活定位超分辨荧光成像的罗丹明分子设计. 中国科学: 化学, 2017, 47: 926-932
Ye Z, Yang W, Xiao Y. Molecular design of rhodamine dyes for photoactivated localization microscopy. *Sci Sin Chim*, 2017, 47: 926-932, doi: 10.1360/N032017-00043

表面蛋白的超分辨成像. 另一种PALM罗丹明设计思想基于笼式(caged)荧光染料. 2010年, Hell等^[21]通过重氮盐的引入设计, 开发了新型笼式罗丹明; 2012年, Johnsson等^[20]改造了传统的笼式罗丹明并应用于固定细胞超分辨成像. Lavis等^[10]倍增了笼式罗丹明的荧光量子产率并实现了线粒体的超分辨成像. PALM型罗丹明已成为新染料开发设计的热门领域, 但目前领域内缺乏对这些新型罗丹明染料的设计策略总结. 因此, 本文将通过介绍PALM成像原理, 给出PALM活细胞超分辨成像染料的设计要求, 并分析和综述了PALM型罗丹明染料的设计策略及各方案的优缺点, 希望为研究者设计和开发具有更高发光效率、更适用于活细胞超分辨成像的罗丹明染料提供指导.

2 染料设计要求

PALM超分辨成像属于单分子定位超分辨成像, 其原理如图1所示. 通过收集在时间和空间上分隔开染料分子的发光, 然后对每个信号进行数学拟合, 找到分子在空间真实分布的位置, 最终在新图上叠加所有的位置信息, 完成高分辨率成像. PALM超分辨成像与随机光学重构显微技术(STORM)等其他超分辨成像方法的不同之处是, PALM染料在成像前处于暗态, 即完全不发荧光或仅发出微弱荧光的状态^[1,2,25]. 通过短波光长(或通过双光子激活过程)光照后, 染料分子随机可逆或不可逆地转变为亮态, 在激发光下激发形成单分子信号, 并被不可逆地漂白或可逆地转换为暗态. 不断循环重复上述过程, 直到积累足够多亮态信号, 最终完成PALM的超分辨成像.

实现PALM超分辨的核心要素是PALM染料, 而这些染料必须具有光可激活的能力. 染料在成像前应当处于无荧光的暗态, 当激活光照射后, 染料随机转换为具有较强荧光的亮态. 染料分子的暗态与亮态的荧光强度必须具有极大的差异, 以利于形成具有较高信噪比的单分子信号. 如果染料暗态在激活前也能够发

出一定程度的荧光信号, 那么亮态的单分子信号将可能会湮没在强烈的暗态背景荧光信号中, 限制超分辨成像的分辨率. 当染料的亮态具有比较好的荧光信号, 同时暗态又完全无荧光时候, 这个染料就具有PALM超分辨成像潜力.

决定PALM成像质量的关键因素是染料亮态的亮度^[26]. 由于PALM属于单分子定位超分辨技术的一种, 这些技术需要将单分子的光子分布进行数学拟合分析, 找到分子在真实空间的位置. 而这个定位分析的精度由单分子发出的光子数决定, 其定位精度可近似为 $\sigma=S/(N)^{1/2}$, S 为模拟单分子点扩散的高斯函数的标准方差(与分子荧光波长相关的参数), 而 N 为单分子发出光子数^[1]. 即发出光子数越多, 单分子的定位精度越高, 最终可以实现的超分辨成像的分辨率也越高.

综上所述, PALM成像的原理对染料提出两个要求, 即具有光激活能力, 且亮暗态的荧光亮度差异性越大越好; 同时单分子发出足够多的光子数.

3 染料设计策略

如上所述, 最佳的PALM染料设计, 应当是让染料激活前处于完全无荧光的暗态, 而在被光诱导激活后又形成强荧光发射的亮态. 罗丹明作为非常经典的一类染料, 目前用于设计PALM染料的策略有两种. 由于罗丹明螺内酰亚胺本身就具备可见光区高对比度的可逆光激活性质, 一种策略是直接将罗丹明螺内酰亚胺设计成PALM染料. 另一种设计策略则通过利用光可激活基团对罗丹明染料进行笼化(caging), 获得笼式罗丹明. 下面将具体对每一种策略的优缺点进行分析并介绍最近几年研究者在PALM罗丹明分子开发上的进展.

3.1 罗丹明螺内酰亚胺及类似物

罗丹明螺内酰亚胺的光激活前后结构变化如图2(a)所示, 在紫外光的作用下, 可见光区无吸收和发射的罗丹明螺内酰亚胺的螺环被打开, 生成具有可见光区强烈荧光发射的双离子盐(zwitterion)亮态^[24]. 这种双离子盐形式在极性溶液中的存在时间非常短(几百毫秒)^[27], 但在酸性环境下, 可以稳定存在. 基于这种酸性诱导罗丹明螺内酰亚胺开环的原理, 研究者开发了一系列针对pH和Lewis酸金属离子的探针^[28-37].

第一例罗丹明螺内酰亚胺的设计和PALM超分辨

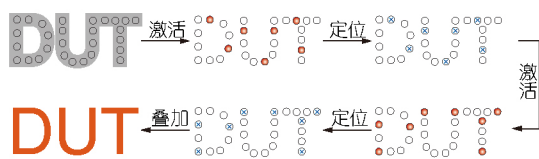


图1 PALM成像原理(网络版彩图)

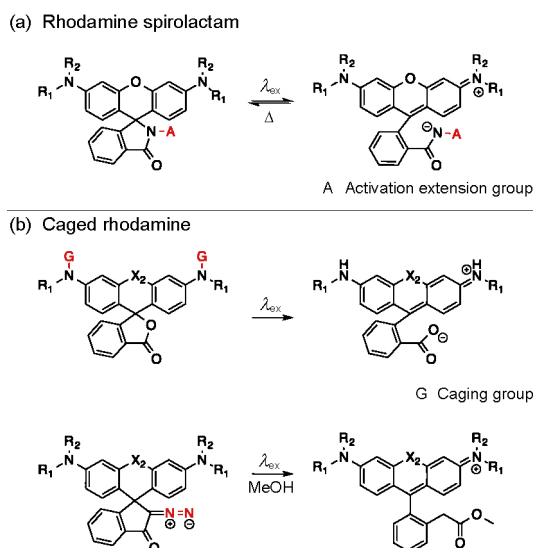


图2 PALM罗丹明的激活机理. (a) 罗丹明螺内酰亚胺; (b) 笼式罗丹明(网络版彩图)

成像始于2007年, 由Hell等^[15]共同研究完成的, 其分子结构见表1的分子1. 它采用了邻苯二甲酰亚胺的结构, 保证了可在近紫外区激活罗丹明螺内酰亚胺; 另外, 通过邻苯二甲酰亚胺的结构提供了灵活添加特异性标记基团的位置, 最终实现对不同客体(包括固定细胞内的微管蛋白和体外的微球)的标记和三维超分辨成像. 但这种修饰方式, 并不太有利于染料本身的水溶性, 并且这种染料的膜通透性也不理想, 活细胞成像实现很困难.

为实现多色PALM成像并提高染料的水溶性, Hell等^[16]进一步设计了多种不同衍生的罗丹明螺内酰亚胺. 通过在图3上标出的罗丹明染料的R₄、R₅位置衍生磺酸基, 有效提高罗丹明螺内酰亚胺的水溶性. 另外, 对氧杂蒽两侧芳胺进行刚性环固定(结构见表1分子2), 不仅延长了分子的荧光发射波长, 而且提高了荧光量子产率.

罗丹明螺内酰亚胺通常需要使用紫外光进行激活, 但紫外光对于活细胞具有很高的光毒性^[38]. 为了避免紫外光的伤害, Moerner等^[17]在罗丹明的A位置选择了具有更长吸收波长的吡啶乙烯苯基(结构见表1分子3), 将这类罗丹明螺内酰亚胺的激活波长延展到了接近可见光区的波长(405 nm), 减少了紫外激活光对生物样本的损伤.

罗丹明螺内酰亚胺的激活能力设计关键影响因素

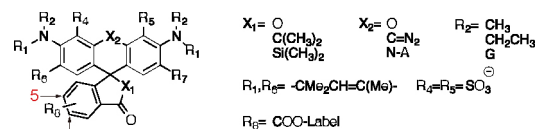


图3 PALM罗丹明衍生位点(网络版彩图)

在于A基团的选择(图2(a)). 一方面, A基团应当具有相当强的近紫外区吸收, 可以有效延长激活光的波长, 避免紫外光对生物样本的损伤; 另一方面, A基团应尽可能小, 以避免对染料整体的生物相容性(包括膜通透性)产生影响. 而罗丹明螺内酰亚胺的发色团的选择, 则决定了PALM超分辨成像的整体成像效果, 具有更好的发光性能的氧杂蒽发色团将进一步提高PALM超分辨成像在生物学中的应用价值.

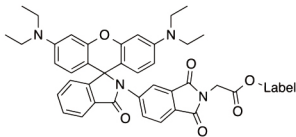
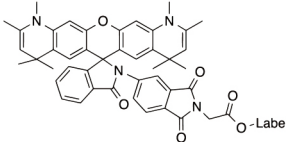
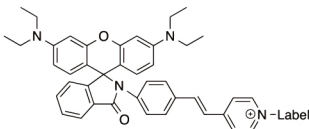
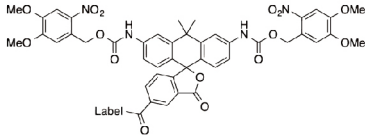
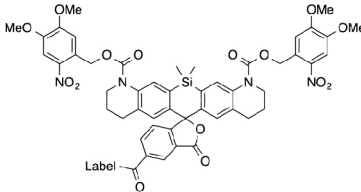
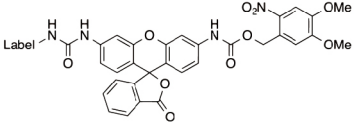
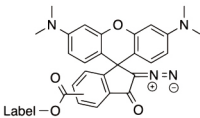
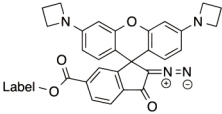
3.2 笼式(caged)罗丹明

除了利用罗丹明螺环本身的光激活特性, 研究者还将可光激活的笼化基团加到罗丹明类染料上, 同样实现了PALM超分辨成像. 这一类罗丹明染料分子有两种笼化策略, 机理示意图如图2(b)所示: (1) 对罗丹明两侧芳胺笼化; (2) 对罗丹明染料的五元内酯环进行笼化改造.

双侧笼化的基团通常是甲酸(邻硝基苄基)酯的结构. 这种酯在紫外光照下, 迅速发生水解反应, 生成二氧化碳、对应硝基苯基甲醇和具有强荧光的罗丹明亮态. 然而, 这种笼化罗丹明的方式需要同时对罗丹明两侧的胺进行修饰, 受限于芳胺的较低反应活性, 合成的难度较大. Lavis等^[39]通过还原罗丹明的氧杂蒽, 提高了罗丹明两边芳胺的活性, 降低了这种双侧笼式罗丹明的合成难度, 并由此合成了一系列的笼式罗丹明. 同时, 为了解决这种笼化模式罗丹明的亮态波长较短的局限性, 他们进一步设计开发了长波长碳基罗丹明(表1分子4)^[18]和硅基罗丹明(表1分子5)^[19], 并利用它们实现了对固定肌动蛋白的超分辨成像.

双侧笼化模式虽然成功地抑制了罗丹明本身的发光, 但这种设计策略比较复杂, 并且不利于活细胞超分辨成像^[40]. 双侧笼化的策略意味着光激活的反应需要经过两步, 才能获得预期的荧光亮态, 光激活的效率降低了. 另外, 光激活后的产物硝基苯甲醇类化合物对细胞存在较强的毒性, 不利于细胞生物学研究. 如果能减少笼化基团的个数, 将有效提高激活效率并减

表 1 PALM 罗丹明染料的结构及其应用

分类	编号	染料核心结构	关键性能	应用体系	可能存在的问题	文献
罗丹明螺内酰亚胺及类似物	1		第一例罗丹明螺内酰亚胺应用于超分辨成像研究, 并且用双光子过程实现激活.	荧光微球标记成像; 抗体标记对固定细胞微管超分辨成像.	染料不具有活细胞标记并进行超分辨成像的能力.	[15]
	2		染料延长了亮态荧光发射波长.	实现了对固定细胞的微管蛋白和网格蛋白的双色超分辨成像.	染料依旧未能实现活细胞标记和超分辨成像.	[16]
	3		将罗丹明螺内酰亚胺结构的激活波长延长至 405 nm.	细菌细胞膜表面蛋白的活细胞超分辨三维成像.	染料的活细胞超分辨成像仅限于细胞膜表面蛋白.	[17]
笼式罗丹明	4		第一例碳基笼式罗丹明, 具有较长的吸收和发射波长.	固定细胞的肌动蛋白超分辨成像.	分子结构庞大, 可能潜在的膜通透性较差.	[18]
	5		第一例硅基罗丹明, 具有近红外的吸收发射.	对固定细胞的肌动蛋白以及线粒体的双色超分辨成像.	分子结构大, 不具有较好的生物相容性.	[19]
	6		单侧笼化的策略, 有效提高激活效率并减少对细胞潜在毒性.	对固定细胞线粒体进行超分辨成像.	不对称合成难度系数较大.	[20]
	7		创造性地对罗丹明的五元螺环进行重氮化笼化, 从而避免较大的双侧笼化基团对分子设计限制.	通过激活光控制, 实现了对固定细胞的微管、过氧化物酶体和肌动蛋白的三色超分辨成像.	染料被激活后部分形成不发荧光的结构, 丢失信号.	[21]
	8		将四元环引入重氮化笼化罗丹明设计, 提高了荧光量子产率.	对线粒体的超分辨成像及单分子追踪; 对细胞核两种蛋白的双色超分辨成像.	与染料 7 的情况相似.	[10]

少对细胞的毒性. Johnsson等^[20]通过不对称修饰, 将罗丹明一边引入可以通过光诱导电子转移(PET)效应抑制染料发光的鸟嘌呤结构, 另一边保持笼化结构, 使得染料保持光可激活的效应(结果见表1分子6). 这样, 罗丹明在光照激活后, 染料将因为鸟嘌呤的PET效应, 保持极弱荧光状态. 当染料特异性连接上对鸟嘌呤识别的SNAP蛋白后, 由于鸟嘌呤基团的解离, 染料将重新恢复荧光. 这样的设计同时保证了染料的特异性和染料的光可激活能力, 最终实现线粒体的PALM超分辨.

第二种笼式罗丹明是由Hell等^[21]设计实现, 其分子结构见表1分子7. 通过将五元环内酯变为五元环酮的结构, 将罗丹明限制在螺环的隐色体, 形成暗态的罗丹明. 对活泼的羰基 α -亚甲基进行重氮化修饰, 稳定了罗丹明的五元环, 形成了暗态罗丹明. 在激活光照的情况下, 重氮盐由于高光敏活性, 发生解离, 最终生成具有荧光发射的亮态分子. 这个转换过程可能与活泼羰基亚甲基自由基重排相关. 由于只有一个笼化基团, 染料的激活效率得到提高, 同时鉴于笼化基团较小的分子体积, 对母体染料的影响较小, 更易进行设计和衍生. 例如, Lavis等^[10]在这种笼式罗丹明基础上开发的四元环PALM罗丹明(结构见表1分子8), 通过抑制染料的扭曲分子内电荷转移(TICT)效应, 提高了PALM超分辨成像的效果. 然而, 这种笼化策略存在一个小问题: 部分染料在被激活后形成一种不发荧光的分子结构^[10,21], 导致了信号的丢失, 可能会影响超分辨成像的质量.

目前, 笼式PALM罗丹明设计思路主要受限于有限的笼化基团, 并且目前开发的可适用于活细胞超分辨成像的笼式罗丹明还十分有限. 双侧笼化本身具有较高的合成难度以及较低的激活效率, 单侧笼化则必须通过电子转移等巧妙设计, 降低或消除染料在单侧笼化后的荧光. 另外一种五元环笼化模式巧妙通过一个小的重氮化修饰, 减少了激活基团的体积, 提高了笼化设计的罗丹明的衍生能力. 但是其在激活后会产生两种不同荧光性质的分子结构, 其中不发光的结构会导致信号丢失, 从而不利于实现超分辨成像. 因此, 未来的超分辨研究期待着研究者开发更高效的、体积更小的笼化基团, 并利用它们设计出具有更好生物相容性及更强荧光性质的PALM罗丹明.

3.3 PALM罗丹明的标记设计

将PALM罗丹明染料进一步应用在生物学超分辨

成像上, 还需进一步衍生对生物靶标分子标记基团. 罗丹明标记衍生位点(图3)通常会保留在不共轭的苯环5,6位上, 然而这种衍生方法在合成时候会面临异构体拆分的难题(图4 I策略). 许多研究中为了简化合成步骤, 直接采用了混合异构体对生物样本进行标记^[21]. 然而, 直接用混合异构体进行标记忽略了5,6位异构体的差异性, 并不是令人满意的做法^[41]. 另外一个罗丹明标记衍生的位点位于罗丹明染料两侧的芳胺取代基 R_1 和 R_2 上, 通过不对称合成, 可以从其中一个胺基衍生出可对生物样本进行修饰的位点, 如图4 II策略. 然而, 这种不对称分子的荧光性能会降低. 对于罗丹明螺内酰亚胺来说还有一个可能的标记衍生位点位于酰胺的取代基A上. 取代基A不仅可以为罗丹明螺内酰亚胺提供更高的紫外激活活性, 同时也可以在这个取代基上进一步修饰生物靶标的标记基团, 如吡啶乙炔基苯取代的罗丹明螺内酰亚胺分子(图4 III策略)^[17], 通过对吡啶的季铵化修饰, 为染料提供了对活细胞细胞膜表面裸露蛋白的标记能力.

目前为止, 为PALM罗丹明染料设计和衍生有效的标记仍是具有难度的一件工作. 考虑到罗丹明染料有限的衍生位置, 以及它们对于罗丹明染料发光的影响, 5,6位的衍生是不影响激活基团设计的最佳选择. 但5,6位罗丹明异构体的拆分仍十分困难, 分子设计和合成研究者们仍需进一步降低异构体拆分的难度, 或是在发展罗丹明新标记位点上继续努力.

4 结论与展望

目前, PALM罗丹明染料的设计主要依托于两种光激活策略, 即螺环模式和笼化模式. 罗丹明螺内酰亚胺, 由于本身具有光可激活的性质, 可以直接设计为PALM罗丹明. 对其修饰可以通过衍生A基团, 获得

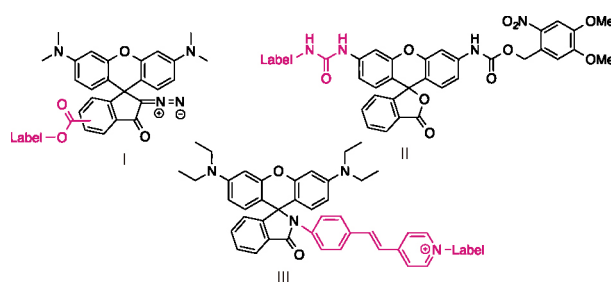


图4 PALM罗丹明分子的3种标记设计策略(网络版彩图)

近紫外区光的可激活能力, 并从A基团衍生获得生物样本标记的能力. 这种罗丹明螺内酰亚胺对设计的约束很小, 可以通过对罗丹明氧杂蒽的修饰, 改善罗丹明螺内酰亚胺染料的发光性质、水溶性以及细胞膜通透性. 笼化罗丹明有两种设计, 一种依托于罗丹明双侧的芳胺的改造, 通过光可激活的硝基苄基甲酸酯使罗丹明染料保持在暗态; 另外一种基于稳定罗丹明五元环的思想, 同时利用重氮盐的光可激活性, 形成了一种新型的笼化罗丹明. 双侧设计合成难度较大, 染料分子庞大, 而重氮盐的设计兼顾了单一笼化基团光激活效率以及较小的分子体积. 因此, 相对传统的双侧设计, 重氮盐为笼式罗丹明的理想选择. 然而, 目前笼式罗丹明的设计仍有局限性, 重氮盐设计罗丹明

在被激活后, 有部分分子会转换成一种无荧光的产物, 造成单分子信号的丢失, 影响整体PALM成像效果.

未来PALM罗丹明染料设计可能会朝向开发更高效、体积更小的激活基团方向努力. 优秀的可激活性质, 可以有效减少生物样本在紫外光的暴露时间和强度; 同时体积较小的激活基团可以有效改善染料的生物相容性. 下一代的PALM罗丹明染料将兼具高效的光激活特性、优秀的荧光发光亮态以及对各种不同生物靶标分子的特异性标记能力. 本文综述了PALM罗丹明染料分子设计, 通过对PALM超分辨成像原理的分析, 给出了设计PALM罗丹明染料应当满足的性质. 希望本文能抛砖引玉, 为研究者开发和设计新的PALM超分辨罗丹明染料提供一些帮助.

致谢 感谢大连理工大学精细化工国家重点实验室对本文的支持.

参考文献

- Betzig E, Patterson GH, Sougrat R, Lindwasser OW, Olenych S, Bonifacino JS, Davidson MW, Lippincott-Schwartz J, Hess HF. *Science*, 2006, 313: 1642–1645
- Rust MJ, Bates M, Zhuang X. *Nat Meth*, 2006, 3: 793–796
- Yang Z, Sharma A, Qi J, Peng X, Lee DY, Hu R, Lin D, Qu J, Kim JS. *Chem Soc Rev*, 2016, 45: 4651–4667
- Fernández-Suárez M, Ting AY. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008, 9: 929–943
- Zhang M, Chang H, Zhang Y, Yu J, Wu L, Ji W, Chen J, Liu B, Lu J, Liu Y, Zhang J, Xu P, Xu T. *Nat Meth*, 2012, 9: 727–729
- Subach FV, Patterson GH, Manley S, Gillette JM, Lippincott-Schwartz J, Verkhusha VV. *Nat Meth*, 2009, 6: 153–159
- Grimm JB, English BP, Chen J, Slaughter JP, Zhang Z, Revyakina A, Patel R, Macklin JJ, Normanno D, Singer RH, Lionnet T, Lavis LD. *Nat Meth*, 2015, 12: 244–250
- Lavis LD, Raines RT. *ACS Chem Biol*, 2014, 9: 855–866
- Lavis LD, Raines RT. *ACS Chem Biol*, 2008, 3: 142–155
- Grimm JB, English BP, Choi H, Muthusamy AK, Mehl BP, Dong P, Brown TA, Lippincott-Schwartz J, Liu Z, Lionnet T, Lavis LD. *Nat Meth*, 2016, 13: 985–988
- Gu X, Zhao E, Zhao T, Kang M, Gui C, Lam JWY, Du S, Loy MMT, Tang BZ. *Adv Mater*, 2016, 28: 5064–5071
- Lukinavičius G, Reymond L, Umezawa K, Sallin O, D'Este E, Göttfert F, Ta H, Hell SW, Urano Y, Johnsson K. *J Am Chem Soc*, 2016, 138: 9365–9368
- Qian X, Xiao Y, Xu Y, Guo X, Qian J, Zhu W. *Chem Commun*, 2010, 46: 6418–6436
- Zhang X, Xiao Y, Qi J, Qu J, Kim B, Yue X, Belfield KD. *J Org Chem*, 2013, 78: 9153–9160
- Fölling J, Belov V, Kunetsky R, Medda R, Schönle A, Egner A, Eggeling C, Bossi M, Hell SW. *Angew Chem Int Ed*, 2007, 46: 6266–6270
- Belov VN, Bossi ML, Fölling J, Boyarskiy VP, Hell SW. *Chem Eur J*, 2009, 15: 10762–10776
- Lee MK, Rai P, Williams J, Twieg RJ, Moerner WE. *J Am Chem Soc*, 2014, 136: 14003–14006
- Grimm JB, Sung AJ, Legant WR, Hulamm P, Matlosz SM, Betzig E, Lavis LD. *ACS Chem Biol*, 2013, 8: 1303–1310
- Grimm JB, Klein T, Kopeck BG, Shtengel G, Hess HF, Sauer M, Lavis LD. *Angew Chem*, 2016, 128: 1755–1759
- Banala S, Maurel D, Manley S, Johnsson K. *ACS Chem Biol*, 2012, 7: 289–293
- Belov VN, Wurm CA, Boyarskiy VP, Jakobs S, Hell SW. *Angew Chem Int Ed*, 2010, 49: 3520–3523
- Pan D, Hu Z, Qiu F, Huang ZL, Ma Y, Wang Y, Qin L, Zhang Z, Zeng S, Zhang YH. *Nat Commun*, 2014, 5: 5573
- Beija M, Afonso CAM, Martinho JMG. *Chem Soc Rev*, 2009, 38: 2410–2433

- 24 Knauer K-H, Gleiter R. *Angew Chem Int Ed*, 1977, 16: 113
- 25 Hess ST, Girirajan TPK, Mason MD. *Biophys J*, 2006, 91: 4258–4272
- 26 Deschout H, Cella Zanacchi F, Mlodzianoski M, Diaspro A, Bewersdorf J, Hess ST, Braeckmans K. *Nat Meth*, 2014, 11: 253–266
- 27 Willwohl H, Wolfrum J, Gleiter R. *Laser Chem*, 1989, 10: 63–72
- 28 Chen X, Pradhan T, Wang F, Kim JS, Yoon J. *Chem Rev*, 2012, 112: 1910–1956
- 29 Kim HN, Lee MH, Kim HJ, Kim JS, Yoon J. *Chem Soc Rev*, 2008, 37: 1465–1472
- 30 Li K, Xiang Y, Wang X, Li J, Hu R, Tong A, Tang BZ. *J Am Chem Soc*, 2014, 136: 1643–1649
- 31 Mahato P, Saha S, Suresh E, Di Liddo R, Parnigotto PP, Conconi MT, Kesharwani MK, Ganguly B, Das A. *Inorg Chem*, 2012, 51: 1769–1777
- 32 Nolan EM, Lippard SJ. *Chem Rev*, 2008, 108: 3443–3480
- 33 Wang T, Zhao QJ, Hu HG, Yu SC, Liu X, Liu L, Wu QY. *Chem Commun*, 2012, 48: 8781–8783
- 34 Yu H, Xiao Y, Guo H, Qian X. *Chem Eur J*, 2011, 17: 3179–3191
- 35 Zhan XQ, Qian ZH, Zheng H, Su BY, Lan Z, Xu JG. *Chem Commun*, 2008, 7: 1859
- 36 Zhang X, Xiao Y, Qian X. *Angew Chem Int Ed*, 2008, 47: 8025–8029
- 37 Zhu H, Fan J, Xu Q, Li H, Wang J, Gao P, Peng X. *Chem Commun*, 2012, 48: 11766–11768
- 38 Wäldchen S, Lehmann J, Klein T, van de Linde S, Sauer M. *Sci Rep*, 2015, 5: 15348
- 39 Wysocki LM, Grimm JB, Tkachuk AN, Brown TA, Betzig E, Lavis LD. *Angew Chem Int Ed*, 2011, 50: 11206–11209
- 40 Kobayashi T, Urano Y, Kamiya M, Ueno T, Kojima H, Nagano T. *J Am Chem Soc*, 2007, 129: 6696–6697
- 41 Yu H, Xiao Y, Guo H. *Org Lett*, 2012, 14: 2014–2017

Molecular design of rhodamine dyes for photoactivated localization microscopy

Zhiwei Ye[†], Wei Yang^{†*}, Yi Xiao^{*}

State Key Laboratory of Fine Chemicals, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China

[†]These authors contributed equally to this work

*Corresponding authors (email: yw917@dlut.edu.cn; xiaoyi@dlut.edu.cn)

Abstract: Super resolution imaging including photoactivated localization microscopy has provided diffraction breaking tool for biological research. One of the keynotes of super resolution imaging is high performance dye. Resulting from its high fluorescent performance, rhodamine has been widely chosen as the fluorophore core for designing PALM dye. This paper demonstrates the qualification of PALM dye for super resolution imaging. Subsequently through analyzing the gap between rhodamine designs, both the strengths and weaknesses of strategies are illustrated. This mini review on molecular design of rhodamine may help the future development of high performance PALM dye.

Keywords: PALM, super resolution, rhodamine, spirolactam, caged rhodamine

doi: [10.1360/N032017-00043](https://doi.org/10.1360/N032017-00043)