低光毒探针“点亮”线粒体

作者：writer 来源：爱科学

本文原地址：https://www.iikx.com/news/progress/10871.html

本文仅供学习交流之用，版权归原作者所有，请勿用于商业用途！

低光毒探针“点亮”线粒体。超分辨成像技术是21世纪发展最为迅速的研究领域之一。在超分辨成像技术的推动下，人类有了探索微观领域的有效途径和方法，生物学特别是细胞生物学由此进入一个全新时代。

工欲善其事，必先利其器。成像技术是极为交叉的尖端技术，需要新算法、新仪器、新探针融合创新，从而为生命科学和医学研究提供新工具。然而，就目前而言，高端成像仪器/探针等高精尖设备、关键技术都被国外进口产品所垄断，卡住了我国提高生命科学研究技术水平的脖子。

近日，英国皇家化学会旗舰期刊Chemical Science以在线形式发表的一项最新研究成果显示，来自北京大学和西湖大学的研究人员合作研发出两款新型探针——PK Mito Red（PKMR）和 PK Mito Deep Red（PKMDR），首次在活细胞水平上实现了光毒性的明显降低。

突破超分辨成像卡脖子问题

为了能进一步揭开细胞生物学过程的神秘面纱，研究人员发展了各种各样的生物成像技术。其中，荧光超分辨率成像因简单的成像条件及对生物样品的相容性脱颖而出。

为了揭示更精细的结构，荧光超分辨率成像往往需要更多的光子，因此业内一直将目光聚焦在如何改善荧光探针光稳定性的问题上。但其实活细胞超分辨率成像中除了需要荧光探针在漂白之前发出更多的光子外，漂白过程中产生的光毒性往往也不可忽视。

2018年，北京大学分子医学研究所陈良怡团队研发的海森结构光显微镜（Hessian SIM），首次揭示了活细胞中线粒体的精细内嵴结构及其动态变化。为了满足新型光学显微镜的需求，国内外诸多科研团队发展了多种光稳定性的新型线粒体探针，用于观察线粒体内嵴结构。

然而，超分辨率成像需要的高激发光强往往使线粒体荧光探针更易产生活性氧物种（ROS），而且其不随采样时间的间隔增加而消失。这样的超分辨率成像，即便荧光探针本身并未被完全漂白，也将迅速破坏线粒体内嵴，使线粒体发生肿胀、变圆。

光毒性虽然对光学分辨率没有影响，但是会对细胞结构产生极大影响，细胞会受伤害甚至死亡，这种情况下看到的东西与生理反应完全不同。此项工作的通讯作者之一、北京大学分子医学研究所研究员陈知行告诉《中国科学报》。

换句话说，活细胞超分辨率成像需要解决的主要问题实际上是改善光毒性，而不仅仅是光漂白。

针对这一领域的新痛点，陈知行团队利用分子内缀合环辛四烯的策略，成功合成了两种新型低光毒性线粒体荧光探针——PKMR和PKMDR，首次在活细胞水平上实现了光毒性的明显降低。

不仅如此，陈知行团队通过与陈良怡团队、西湖大学雷凯团队合作，通过更进一步的实验，证明新染料对细胞的光毒性显著低于MitoTracker系列商业染料，可实现1000帧以上、线粒体内嵴形状基本不变的超分辨成像；首次证明该探针可以用于涡虫的干细胞流式分选，且不影响干细胞的多能性，可以真正用于研究如干细胞重编程等生理过程中的线粒体功能。

低光毒 更温柔

科学研究不仅要知其然，更要知其所以然。在这项研究中，三支团队不仅让人们重新认识到光毒性对细胞结构的影响，还使用不同的实验手段和方式验证了光毒性是成像试验中更重要的制约因素，为透彻揭示两种新型低光毒线粒体荧光探针提供了科学的解释。

陈知行介绍，荧光探针的光毒性一般来自于激发过程中由第一激发单重态（S1）经过系间窜跃产生的第一激发三重态（T-1），T1态与氧气作用可产生单线态氧等活性氧物种，进而破坏生物分子。

为了最大程度抑制这一过程从而减少光毒性，团队采用了之前应用于染料激光、单分子成像等领域减少光漂白的分子内缀合三线态淬灭剂（自修复染料 Self-Healing Dye）的策略。HeLa细胞的光照存活实验发现，常见三线态淬灭基团中只有环辛四烯（COT）能有效降低荧光成像中的光毒性。更为重要的是，团队还观察到，能够降低光漂白的基团（硝基苯）并不一定能减少光毒性。

正因为如此，荧光探针的光毒性和光漂白性质应该被分别测试，但以往的荧光探针设计中往往忽视了对探针光毒性等性质的详细表征。陈知行解释道。

在此基础上，团队以COT作为三线态淬灭基团，合成了两种以Cyanine为母核的荧光探针PKMR和PKMDR。HeLa细胞的光照存活实验表明，新探针的光毒性较对应光谱的商业探针（MitoTrackers）低5倍以上，并能在相同条件下提供相同甚至更高的亮度。

可以说，此项工作为领域找到了新方向，未来希望能将探针的光毒性降到更低，甚至彻底消除。陈知行充满信心地表示。

协同创新 迈向极致

陈知行、陈良怡及其团队背靠的北京大学分子医学研究所成立于2005年，围绕生物成像这个新兴的交叉领域，分子医学所运筹帷幄，前瞻性布局，创立了分子探针技术研究室，使得探针技术、显微镜技术以及科学问题能够相互启发，紧密合作。

多年来，研究室始终践行分子医学所集成创新的理念和从分子到人的战略，通过开发多样、精准且精美的分子工具，推动生命科学基础研究各个层面的广泛发展。

2018年6月，回国后的陈知行加入到分子医学所。彼时，陈良怡团队研发的Hessian SIM不仅将光学显微镜的性能提升到一个全新的高度，还从数学和物理两方面大大改善了超分辨成像技术的光毒性。

为了将超分辨成像技术做到极致，必须要从化学探针方向进行协同创新。而化学研究出身的陈知行的加入，无疑为团队注入了一股强劲的动力。

从2018年6月开始进行探针研究，到如今取得重要突破，团队只用了一年多的时间，却迭代了三代设计，最终找到了有效的方案。

长期从事涡虫干细胞再生研究的雷凯团队在测试了新探针在涡虫干细胞分选领域的应用后，发现新探针标记线粒体可以帮助分选出干细胞群，而且新探针标记的干细胞在体外仍能维持较好的活性和干性，充分展示了其在流式荧光分析分选中优秀的生物相容性。

更难能可贵的是，新探针在长时程超分辨成像方面也显示出卓越的优势。Hessian SIM成像结果显示，新探针在提供了接近2D Hessian-SIM理论分辨率，展示了清晰的线粒体嵴结构图像的同时，最大程度地保留了线粒体健康的原始形态。而使用商业染料MitoTracker Red CMXRos（MTR）标记的线粒体在140帧左右就发生了肿胀和明显形变，200帧以上已不可见嵴等正常生理结构，而PKMR标记的线粒体可以提供1000帧以上的健康线粒体图像，2000帧左右线粒体的形变程度仍小于商业探针的200帧。

在科研探索的道路上，创新永无止境。下一步，我们将继续在数学、物理、化学三方面协同推进，把技术推到极致。同时，争取将来发力转化，打破外国公司在高端成像仪器/探针方向的垄断，真正实现为生物医学研究者提供超越国外产品的国产高端成像工具。陈知行表示。（来源：中国科学报倪伟波 唐琳）

相关论文信息：https://doi.org/10.1039/D0SC02837A

版权声明：凡本网注明来源：中国科学报、科学网、科学新闻杂志的所有作品，网站转载，请在正文上方注明来源和作者，且不得对内容作实质性改动；微信公众号、头条号等新媒体平台，转载请联系授权。邮箱：shouquan@stimes.cn。
作者：陈知行等 来源：《化学科学》

更多 科学进展 请访问 https://www.iikx.com/news/progress/

本文版权归原作者所有，请勿用于商业用途，爱科学iikx.com转发