

多炔彩虹探针在生物学研究中的应用与展望

李雨健^{1,2,3#} 沈微微^{1,2,3#} 殷金环^{1,2,3} 张曦^{1,2,3} 崔亚宁^{1,2,3} 赵媛媛^{1,2,3} 林金星^{1,2,3*}

(¹北京林业大学林木育种与生态修复国家工程研究中心, 北京 100083; ²北京林业大学树木与基因编辑研究院, 北京 100083; ³北京林业大学生物科学与技术学院, 北京 100083)

摘要 多炔彩虹探针(Carbow)是一种基于聚炔支架的超多路复用拉曼探针, 通过受激拉曼散射(stimulated Raman scattering, SRS)显微技术可以对振动频率不同的20余种彩虹探针分子进行区分。利用探针分子的特异性修饰, Carbow可以对活细胞内的多种细胞器, 以及蛋白质和脂质等大分子进行同时成像。多炔分子的高光稳定性与低细胞毒性结合SRS的多通道光学检测将使Carbow在生物学领域具有巨大的应用潜力。该文综述了基于SRS平台的拉曼标记技术和Carbow的设计合成原理与优势, 并对Carbow在活细胞中不同细胞器的特异性标记成像以及在细胞与组织免疫染色、细胞分选与高通量分析中的生物学应用进行总结。最后, 对拉曼标记技术的提升改进及其在植物学领域中的应用进行了展望。

关键词 多炔彩虹探针; 受激拉曼散射显微技术; 超多路复用光学成像; 拉曼探针标记技术

Application and Prospect of Polyene Rainbow Probes in Biological Research

LI Yujian^{1,2,3#}, SHEN Weiwei^{1,2,3#}, YIN Jinhuan^{1,2,3}, ZHANG Xi^{1,2,3}, CUI Yaning^{1,2,3}, ZHAO Yuanyuan^{1,2,3}, LIN Jinxing^{1,2,3*}

(¹National Engineering Research Center of Tree Breeding and Ecological Restoration, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China; ²Institute of Tree and Genome Editing, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China; ³College of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract Carbow (carbon rainbow) is a super-multiplexed Raman probe based on polyene scaffolds, which can distinguish more than twenty kinds of rainbow probe molecules with different vibrational frequencies through SRS (stimulated Raman scattering) microscopy. Using the specific modification of probe molecules, Carbow can simultaneously image multiple organelles within living cells, as well as macromolecules such as proteins and lipids. The high photostability and low cytotoxicity of polyacetylene molecules combined with multi-channel optical detection of SRS will enable Carbow to have great application potential in the biological field. This article reviews the Raman labeling technology based on the SRS platform and the design synthesis principles and advantages of Carbow. Furthermore, the article summarizes the biological applications of Carbow for the specific labeling imaging of different organelles in living cells, cell and tissue immune-labeling, cell sorting and high-throughput analysis. Finally, the improvement of Raman labeling technology and its application in the field of plant science are prospected.

Keywords polyene rainbow probes; stimulated Raman scattering microscopy; super-multiplexed optical imaging; Raman probe labeling technology

收稿日期: 2022-07-01 接受日期: 2022-08-23

国家自然科学基金(批准号: 32030010、32000558)和中央高校基本科研业务费(批准号: BLX202116)资助的课题

*共同第一作者

*通讯作者。Tel: 13522595178, E-mail: linjx@ibcas.edu.cn

Received: July 1, 2022 Accepted: August 23, 2022

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.32030010, 32000558) and the Fundamental Research Funds for the Central Universities (Grant No.BLX202116)

*These authors contributed equally to this work

*Corresponding author. Tel: +86-13522595178, E-mail: linjx@ibcas.edu.cn

自上世纪30年代印度物理学家RAMAN^[1]发现拉曼效应后,随着显微、激光与纳米技术的引进,拉曼光谱技术不断发展完善,其中拉曼光谱与成像分析技术在生物成像、物质鉴定与分子结构解析等研究中取得了重大成果^[2]。2008年,当时在哈佛大学工作的谢晓亮教授^[3]带领团队开发了受激拉曼散射(stimulated Raman scattering, SRS)显微技术,该技术相比过去的共聚焦拉曼显微术提供了更快的成像速度与更高的灵敏度,将微弱的拉曼信号提高了3~5个数量级^[4]。华人学者如哥伦比亚大学闵玮教授^[5]、普渡大学程继新教授^[6]和复旦大学季敏标教授^[7]等分别在多色拉曼探针标记技术、高光谱相干拉曼散射(hyperspectral coherent Raman scattering, HS-CRS)以及光敏拉曼探针开发等方面作出了巨大的贡献。

SRS作为一种多通道光学成像技术可通过外源类似物标记或拉曼探针对生物体内的不同细胞,细胞内的不同细胞器以及多种蛋白质、脂质和核酸等大分子进行同时成像^[8-10]。利用SRS区分特定化学键的生物正交化学成像技术特点,通过设计由不同类型与数量化学键组合的化学分子作为振动标签可以突破荧光标记的“颜色限制”^[11]。为进一步提高SRS成像的特异性,通过化学合成拉曼探针染料的方式可以极大地扩展通道检测数量。当时在哥伦比亚大学闵玮课题组工作的胡昉昊等^[12]开发的多色彩虹探针Carbow(carbon rainbow),通过掺杂不同数量的炔烃与稳定同位素等方法合成20余种Carbow探针分子,使用不同的Carbow探针并结合荧光通道可以做到对细胞内十种以上物质进行同时成像。除此以外,利用不同拉曼强度的探针组合,Carbow结合纳米粒子在活细胞分选与高通量分析领域将具有巨大的发展前景。

1 SRS成像原理与优势

拉曼光谱作为一种无损分析技术,主要利用激光与样品在相互作用时发生的弹性散射效应,对分子振动能级进行检测得到物质结构信息,其与红外光谱同属于分子振动光谱^[13]。两者差别在于:红外光谱是使用中红外光为主的吸收光谱,拉曼光谱则是使用可见光或近红外光的散射光谱^[14]。傅里叶变换红外光谱(Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR)是获取物质红外吸收光谱的常用技术,在实际应用中常因为其强吸水背景与有限的空间分辨率而

受限^[15]。荧光光谱与拉曼光谱同是发射光谱,都由激光激发造成一个波长更长的光,拉曼光谱仪在收集散射光时连带荧光也会大量收集,荧光效应也因此成为拉曼光谱应用中最常见的信号干扰问题。两种光谱间的差别在于:荧光光谱是通过分子吸收能量产生的电子态跃迁,而拉曼光谱是光发生散射后的振动态跃迁^[16]。在生物学研究中,拉曼光谱可以提供多种条件下的无损定性定量分析,因此逐渐成为分析生物样品内源化学结构的主要工具。

自发拉曼散射(spontaneous Raman scattering)是使用拉曼光谱仪对样品化学键进行检测的常用技术。其劣势在于:仅有极少数的光子(约千万分之一)可以发生自发拉曼散射,因此其得到相应全光谱信息所需的时间很长,并且无成像信息。为提高拉曼成像灵敏度,多种信号增强技术被开发^[17],以相干反斯托克斯拉曼散射(coherent anti-stokes Raman scattering, CARS)和SRS为主的相干拉曼散射(coherent Raman scattering, CRS)显微技术借助相干分子振动所激发的非线性相干拉曼效应使拉曼信号得到大幅增强^[18]。与自发拉曼散射相比,CRS振动激发提高 10^7 倍,检测与成像速度都大幅提高。

SRS显微技术的发展极大地提高了成像的速度与探测灵敏度,使其在面对各种体系时都能够满足其研究需要。为大幅提高振动激发率,SRS采用两束同步激光:泵浦光(pump beam)和斯托克斯光(stokes beam),当两束光同时作用于样品表面且它们之间的振动频率差与样品分子振动频率相匹配时,可以发生共振耦合,形成受激拉曼散射效应。分子从基态跃迁至激发态,泵浦光子与斯托克斯光子转移,泵浦光强度降低,发生受激拉曼损失(stimulated Raman loss, SRL),斯托克斯光强度增强,发生受激拉曼增益(stimulated Raman gain, SRG)。通过对SRL和SRG进行检测,可以得到样品的拉曼位移信息,分析可得拉曼光谱图^[19]。得益于上述设备造成的受激拉曼散射效应,SRS的拉曼信号得到极大提升,成像时间也相应被大幅缩短。以成像单细胞范围为例,普通拉曼技术使用点扫描所需成像时间通常在三小时以上,而SRS则可将时间缩短至数秒。可见,以上多种优势使SRS在实际应用中能够满足不同特定环境体系中高速显微成像的需求。CARS作为CRS显微技术的另外一种,其同样采用两束激光进行共振激发。与SRS相比,CARS的不足之处在于非共振背景的影响使图像

信噪比受到限制, 导致其在实际使用过程中很难进行共振分析。而SRS只有在严格满足共振条件的情况下才会发生受激过程, 这一特点使其很好地规避了非共振背景的干扰。总的来说, 相较于自发拉曼散射技术与CARS, SRS不必浪费大量时间去收集全光谱信息, 只需根据实际需求对感兴趣的单一波数进行高速成像, 其最大优势在于不存在非共振背景的干扰、极快的成像速度与多通道光学检测等。

2 基于SRS等平台的标记技术

SRS成像系统是一种打破传统常规标记的无标记成像技术, 通过对含有大量内源化学键信息如 $400\sim 1\ 800\text{ cm}^{-1}$ 范围内的指纹区(fingerprint region)的C-C、C=C、C=O、酰胺键以及 2800 cm^{-1} 以上的CH伸展区(CH stretch region)的碳氢键等进行检测并成像^[20]。使用拉曼显微技术对样品进行观察时, 指纹区内提供细胞内源信息的化学键众多, 彼此之间形成干扰, 在拉曼图谱上表现为拉曼峰交错重叠。因此, 无标记技术除具有非侵入性等优势外, 相比于探针标记仍具有特异性差、灵敏度低以及拉曼信号弱的局限性^[21]。普渡大学程继新课题组^[22]开发的高光谱SRS(hyperspectral SRS)通过使用非线性谱压缩将拉曼峰宽度由 50 cm^{-1} 降至 9 cm^{-1} , 使指纹区化学键特异性大大提升到能够观察并区分木质素官能团的高分辨率。除了使用高光谱SRS提供内源化学键信息方法, 还可以将化学合成方法与SRS显微技术结合, 通过合成具有独特振动频率的外源性探针, 在 $1\ 800\sim 2\ 800\text{ cm}^{-1}$ 范围内的拉曼静默区(Raman-silent region)提供灵敏度极高、特异性极强的拉曼信号用于SRS特异标记的生物成像(表1)。

2.1 稳定同位素标记

稳定同位素是一些元素中原子质量不同而化学性质相同的一类原子, 其放射性衰变极难发生。稳定同位素常作为示踪剂应用于质谱、核磁共振成像等分析技术之中^[23], 超小尺寸及高稳定性使其在标记过程中对分子的理化性质及整个生物学过程的影响微乎其微。在SRS标记成像中, D(氘)、 ^{13}C 与 ^{15}N 等常作为经典的稳定同位素, 应用于生物标记与过程观察。稳定同位素的原子质量差异导致振动频率不同, 进而使拉曼峰发生偏移, 如C-H处于 $2\ 900\text{ cm}^{-1}$ 的高波数段, 而使用氘标记的C-D键, 拉曼峰则位于 $2\ 100\text{ cm}^{-1}$ 波段即拉曼静默区, 振动光谱区的改变大大加强了氘

标记生物成像的特异性与灵敏性^[24]。在生物标记观察中, 研究人员应用SRS平台通过氘代氨基酸成功对小鼠各组织器官中的蛋白质合成代谢过程进行可视化, 并得到了肿瘤组织中蛋白质合成代谢异质性的观察结果^[25]。PASCUT等^[26]使用拉曼显微镜在植物根部截面进行线扫描, 使用重水(D_2O)替代普通水, 以重水对植物根部吸收水的流动速度与流动方向进行测定, 进而得到植物根吸水的动力学机制。

2.2 三键及三键衍生物标记

以炔烃($\text{C}\equiv\text{C}$)、腈($\text{C}\equiv\text{N}$)以及多炔链为代表的三键及三键衍生物作振动标签与稳定同位素相比, 其尺寸略大但拉曼信号极强且同样位于拉曼静默区。使用炔烃作为标签, 既可以与叠氮化物结合发生环加成反应, 也可与用于检测的荧光基团耦合用于标记成像^[27]。因此, 利用炔烃在拉曼标记成像中具有极高特异性与灵敏性优势, 可以设计合成各类含有炔烃的小分子类似物。5-乙炔基-2'-脱氧尿苷(Edu)是闵玮课题组^[11]设计的核苷类似物, 将Edu等作为前体观察其代谢结合过程, 可以对大分子如核酸等的从头合成进行可视化。YAMAKOSHI等^[28]设计合成了炔烃标记的辅酶Q(coenzyme Q, CoQ)类似物, 成功对细胞中CoQ浓度进行了半定量估算并对CoQ类似物进行了活细胞拉曼标记成像。为进一步提升炔烃的应用范围与灵敏度, 武汉大学胡继明教授课题组^[29]开发了一组用于表面增强拉曼散射(surface-enhanced Raman scattering, SERS)技术的炔烃调制探针组, 其具有窄峰宽、拉曼峰可调移以及高度增强的拉曼信号等优势, 即使用于观察存在细胞壁、叶绿体与色素等自发荧光的巨大干扰环境下的植物花粉细胞, 仍能保持灵敏度极高的多重细胞成像。可见, 以炔烃等为代表的常用三键标签在生物学标记成像中表现出理想的化学与光谱学特征, 同时这类标签具有良好的外源性与生物正交性, 可以保证标记过程的结合稳定性与高度特异性。

2.3 拉曼探针染料标记

为进一步利用SRS的高灵敏度和超多路复用光学成像优势, 一些拉曼探针染料被成功开发。华中科技大学罗亮教授课题组^[30]开发的聚乙二炔(deca-4,6-diyndioic acid, PDDA)提供了极强的炔烃拉曼信号, 同时具有优秀的水溶性和生物相容性。与传统的炔标记相比, PDDA的振动激发增强了 10^4 倍, 其在拉曼静默区的信号强度大幅提升。Carbow是碳

表1 基于SRS平台的不同拉曼探针标记方法比较

Table 1 Comparison of different Raman probe labeling methods based on SRS platform

标记方法 Labeling methods	标记尺寸 Label sizes	标记类型 Label types	优点 Advantages	缺点 Disadvantages
Label-free			Image endogenous chemical bonds without the need for synthetic probes	Relatively poor signal, low sensitivity and specificity
Stable isotope labeling	≈0.1 nm	D, ¹³ C, ¹⁵ N	Suitable for high abundance species without altering the biochemical properties of the target	Average Raman intensity, moderate sensitivity and specificity
Triple-bond and their derivatives labeling	<1 nm	alkyne (C≡C), diyne, nitrile (C≡N)	Strong Raman signal, suitable for low abundance species	Need to design synthetic probes to target different subcellular structures
Super-multiplexed Raman dyes	1-10 nm	Carbow, MARS	High membrane permeability and super multiplexed optical imaging	Lack of ability to track target dynamics
Raman-active nanomaterials	>10 nm	Carbow probes in polystyrene Beads, threecolor Raman-active polymer dots	Raman signal is extremely strong, surface functionalization, and carrier of information	Carrier size limits flexibility in practical applications

彩虹(carbon rainbow)的简称, 作为闵玮课题组^[31]开发的最新一代彩虹探针, Carbow分子采用不同的外源性化学键如炔烃等, 可以在拉曼静默区得到极高灵敏度的拉曼信号, 同时消除大量细胞内源背景信号的影响。中性支架使Carbow具有高度的膜渗透性, 因此可以进入细胞内部对不同的细胞器等进行多色成像, 且具有良好的特异性。与掺杂单个三键标记的类似物或单个炔标记的拉曼探针相比, 以Carbow为代表的超强拉曼探针组具有以下优势: 首先, Carbow等通过将多个具有拉曼静默区信号的小分子如三键等共轭聚合, 形成强度远高于单个标记的长链探针分子, 其信号强度最高可提升四到五个数量级。其次, 超强拉曼探针分子的设计合成采用功能化策略, 如Carbow在合成中通过在端基如苯环的结构上预留不同的接头, 以用来靶向不同细胞结构, 这种方法极大地扩展了探针组的应用范围。最后, 利用不同的合成策略改变探针分子的结构性质, 如PDDA通过主客体拓扑化学聚合(host-guest topochemical polymerization)策略使其成为水溶性分子, 而Carbow通过采用中性支架策略使其能够透过细胞膜进入胞内进行标记。以上超强信号、结构功能化与材料灵活性等优势使Carbow等超强拉曼探针在生物学领域中受到广泛关注并展示了巨大的研究潜力。

2.4 拉曼活性纳米粒子标记

对分析物进行高通量分析与筛选需要大量可提供信息的识别标签, 依靠一组小分子探针无法满

足这一庞大数量的需求。将纳米粒子应用到生物学研究中, 具有信号增强放大、表面功能化以及可作存储传递信息的载体等多个优势^[32]。最近开发的将有机物聚合形成的活性无金属纳米材料可以克服光淬灭等问题, 闵玮课题组^[33]在2017年合成的三色拉曼活性聚合点通过将炔烃、腈和碳氘键等拉曼静默区振动标签结合到苯乙烯单体之上并聚合成聚苯乙烯形成新的纳米粒子。南开大学刘定斌课题组^[34]使用炔烃与腈等三键标记作拉曼探针与金纳米粒子结合, 通过SERS获得了一系列可用于分析癌细胞表达的多种标记物。拉曼信号区分性极强的振动标签提供高灵敏性, 配合纳米粒子本身的高稳定性、低毒性以及载体作用, 使拉曼探针结合纳米粒子在细胞分选、内吞作用以及表面蛋白的特异性成像等方面具有极大的优势^[35-36]。除此之外, 将大量同一或不同组合的Carbow探针置于聚苯乙烯粒子内, 根据Carbow探针生成的不同拉曼强度信息可以得到大量的编码组合以提供不同信息^[31]。因此, 将耦合拉曼标签或探针的纳米粒子用于SRS成像, 可以在保持高灵敏度、高特异性的同时, 解决传输稳定性及高容量问题。凭借以上优势, 具有拉曼活性的结合纳米粒子可以在细胞表型分析及SRS的高通量筛选分析中提供更快速更准确的信息。

3 多炔彩虹探针的设计与合成原理

聚炔材料是将碳碳单键与三键交替组合, 具有

sp杂化碳原子的线性碳原子链^[37]。目前的化学合成技术已经能够合成20个以上的炔烃所聚合形成的化学链, 这些碳链同时具有优秀的高导热性、高拉伸性和高强度等物理特性。因此, 将多炔链作为拉曼静默区振动标签用于SRS成像平台进行多通道光学成像将具有巨大的应用前景与优势。

闵玮课题组^[38]设计合成的第一代超多路复用探针: MARS(Manhattan Raman scattering), 通过将炔烃和腈与近红外的咕吨共轭, 采取调整咕吨中心原子、环数变化与同位素替换等三种方式, 结合电子预共振受激拉曼散射(electronic pre-resonance stimulated Raman scattering, epr-SRS)技术放大其散射信号, 与普通SRS技术相比, MARS在epr-SRS的电子预共振增强下, 信号可以提升四到五个数量级。通过结合商业染料, MARS能够在成像中提供24种以上的可分辨颜色。与MARS不同, 多炔彩虹探针Carbow并不需要电子预共振获得信号增强, 其设计合成主要通过通过对探针分子进行不同端基取代、多炔链炔烃数量调制以及稳定同位素:¹³C掺杂组合等三种方式。在化学合成Carbow探针流程中, 首先通过Glaser-Hay和Cadiot-Chodkiewicz耦合方法合成一系列长度不一的, 端基由苯环取代的多个聚炔链^[39]。将共轭炔基的数量从二炔到六炔逐渐增加, 具有高强度信号窄峰宽(13 cm⁻¹)的拉曼峰在拉曼静默区的2 226 cm⁻¹到2 066 cm⁻¹区间内呈现线性的变化, 这些峰彼此间并不存在串扰, 可以很好的分离。随着炔键数目和拉曼位移的改变, 多炔链的横截面也随之超线性增加, 与二炔链相比, 六炔链强度增强大约30倍。另外, 尽管多炔链是由几个炔烃共轭形成的, 但是这些炔烃在拉曼静默区并不是各自呈现单独的拉曼峰, 而是聚炔共轭形成一个信号更强的单一拉曼窄峰, 这对于区分不同Carbow探针分子更为简便也是十分必要的。可见, 通过增加更多的炔键数量对多炔链的长度进行调制的方式不仅可以提供更多具有独特振动频率的探针分子, 还可以增强信号进而极大的提高探测灵敏度^[31]。

为进一步增加Carbow的静默区标记组合多样性以实现超多路复用设计原则, 同位素掺杂方法可使多炔链的质量发生变化进而改变其振动频率。¹³C作为一种常用的稳定同位素被用于多炔分子的合成之中, 因此可以将¹³C分别掺杂到不同数量的三键之中取代常规的¹²C^[40]。例如, 在四炔链探针分子

中可以分别在炔烃两侧掺杂单个、二重以及三重的¹³C标记, 通过增加¹³C标记炔烃的数量改变多炔链整体的质量, 进而使其振动频率发生变化。对拉曼信号进行检测可以发现在20~80 cm⁻¹小范围内, 四炔链的拉曼峰强度与¹³C标记的数量增加呈线性相关。除此之外, 为了消除¹³C掺杂所带来的粗调影响, 可采用端基取代的方法, 通过不同的给电子或吸电子基团如氨基等替代苯环以进行约2~20 cm⁻¹内的频率微调, 通过这种小范围的调整使不同Carbow探针分子在光谱图上的位置分布更为均匀。

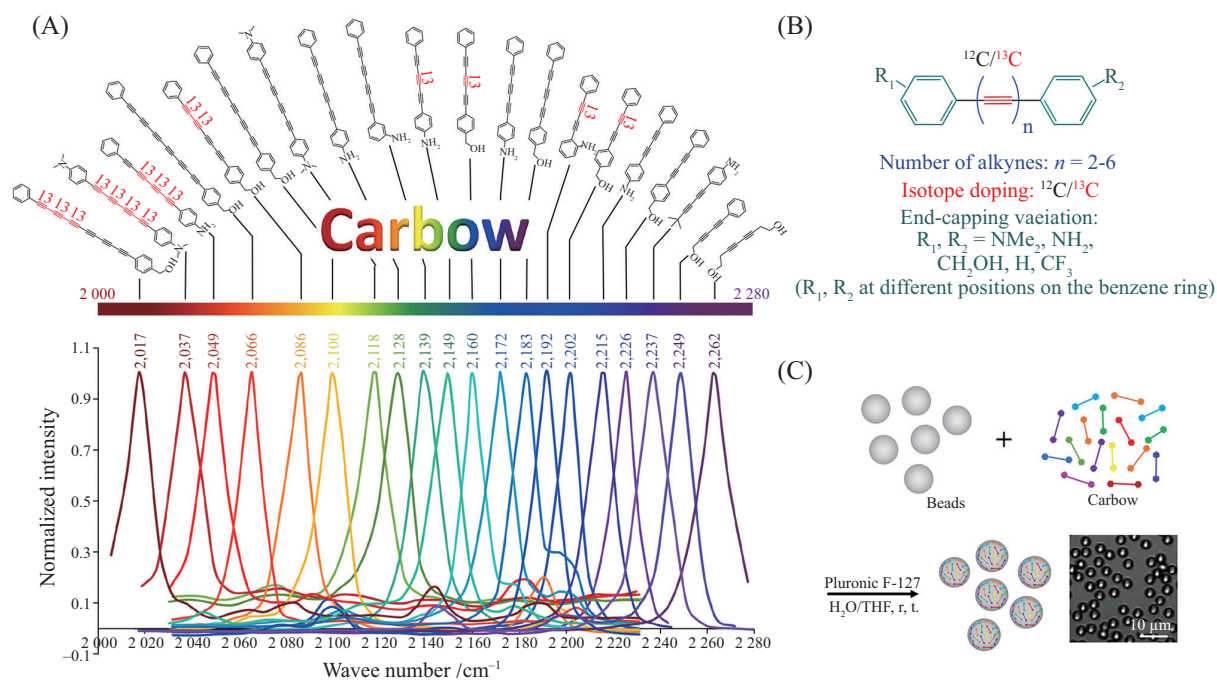
基于以上不同组合的调制方式, Carbow探针的数量可以增加至20个以上, 且不同探针分子的拉曼峰被固定在相应波数, 彼此间分布更加平均, 串扰被大大减少(图1)。在拉曼光谱上, 根据它们拉曼峰位置所对应的波数, 可以分别对其进行相应命名, 如对应2172 cm⁻¹的Carbow探针分子被命名为Carbow2172等。将以上位于拉曼静默区的20种不同的Carbow探针与常用的荧光染料以及在振动指纹区内已报道的多种商业染料结合, 总计可以达到20种颜色以上的光学通道检测能力, 这几乎是现在光学检测领域内可达到最高颜色区分的数量最高值^[41]。Carbow探针的高膜渗透性、高灵敏度、高稳定性以及多色成像能力使其在SRS的多通道超复用光学成像中将得到最大程度的发挥。

4 多炔彩虹探针在生物学中的应用

4.1 活细胞中细胞器多色成像

细胞器是活跃于细胞质中的具有特定结构与功能的亚细胞结构, 对细胞器进行特异性定位观察, 是研究其功能联系与蛋白细胞器互作关系的重要手段^[41-42]。常规荧光标记技术对某些细胞器的标记研究已广泛报道, 但由于荧光光谱存在相互干扰而无法同时对十种以上的细胞器及大分子物质进行多色成像^[43]。依靠多种Carbow探针分子端基的不同基团接头以靶向相应亚细胞结构, 可以成功对活细胞内包括线粒体、溶酶体和内质网等在内的10余种细胞器进行不同颜色标记的多通道光学成像。

Carbow探针分子凭借其中性支架结构所具有的高膜渗透性, 因此可以高效地透过细胞膜进入细胞内, 对胞质中不同的细胞器进行成像。依靠链长调制、端基取代以及稳定同位素的引进, Carbow探针系列的种类被扩大到20种以上。因此, 通过设计



A: Carbow探针的化学结构和拉曼峰; B: Carbow探针的合成原理; C: Carbow与苯乙烯材料的纳米粒子合成聚苯乙烯颗粒的方法。

A: the chemical structure and Raman peaks of the Carbow probes; B: the synthesis principle of the Carbow probes; C: the method for the synthesis of polystyrene particles by Carbow and styrene material nanoparticles.

图1 Carbow探针的化学结构、拉曼峰强度、合成原理以及与纳米粒子结合方式(根据参考文献[31]改编)

Fig.1 Chemical structure, Raman peak intensity, synthesis principle and binding method of the Carbow probes (modified from reference [31])

合成Carbow探针分子的不同端基,例如对连接到苯环不同位点的化学基团进行取代,凭借基团间连接的特异性靶向不同的细胞器,进而可进行多通道精准成像。

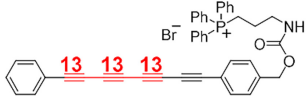

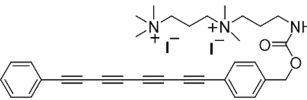
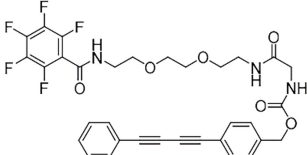
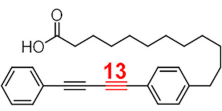
Carbow2141是一个在端基苯环上引入氨基甲酸酯的具有四个炔烃连接的多炔链分子,通过使用不同的化学基团对氨基甲酸酯进行取代,可以精准靶向不同亚细胞结构。携带正电荷的三苯基膦(TPP^+)是与线粒体基质具有高度亲和力的一段结构序列,通过使用 TPP^+ 取代Carbow2141端基的氨基甲酸酯,可以对线粒体进行特异成像。在对其他亚细胞结构进行探针分子的设计合成和靶向方法中,Carbow2141的氨基甲酸酯可被二甲胺基团取代,进而靶向酸性溶酶体腔中的质子化单元做到对溶酶体的标记成像。另外,也可以在Carbow2141端基的氨基甲酸酯上引入携带阳离子的二胺基团,进而与细胞膜上的阴离子磷酸盐基团进行相互作用完成对质膜的成像。如表2所示,基于此原理,使用不同的Carbow探针分子如Carbow2226与Carbow2202等分别利用其端基的特异化学基团以靶向内质网、脂滴

等多种亚细胞结构。以上的SRS多通道成像结果与荧光标记结果呈现高度共定位,这充分体现出Carbow的良好灵敏性^[31]。

4.2 细胞与组织免疫成像

细胞免疫染色是对固定生物样本中的蛋白质等大分子进行亚细胞定位的常用研究手段,通过抗体与抗原之间的特异性结合进行直接或间接染色^[44]。在直接免疫染色中,只需使用荧光显微镜对连接荧光团的一抗进行检测;在间接免疫染色中,使用未结合一抗的荧光团结合二抗之后再行荧光观察^[45]。以上的荧光检测方式面临抗体质量效率不稳定、荧光通道信号灵敏度差与背景影响等多种问题^[46]。对生物体内复杂系统进行结构功能与物质间的相互作用关系研究时,采用具有高分辨率与灵敏度的光学系统对组织或细胞进行动态成像解析是十分重要的。常用的荧光标记技术由于荧光光谱的发射峰过宽(约50 nm)导致峰之间存在相互干扰的问题,因此荧光成像在实际应用中存在四到五种不同颜色的标记上限^[47-48]。与荧光光谱相比,拉曼光谱的峰要窄得多,为了提供更多的通道以加强检测深度,对拉曼

表2 用于不同细胞器标记成像的Carbow探针种类和化学结构式(根据参考文献[31]改编)

Carbow探针类型 Types of Carbow probe	炔烃数目 Number of alkynes	稳定同位素掺杂数目 Number of stable isotopes	化学结构式 Chemical structures	细胞器类型 Organelle types
Carbow2062 Mito	Tetrayne	3		Mitochondria
Carbow2086 Lyso	Tetrayne	2		Lysosome
Carbow2141 PM	Tetrayne	0		Plasma membrane
Carbow2226 ER	Diyne	0		Endoplasmic reticulum
Carbow2202 LD	Diyne	1		Lipid droplets

静默区临近的不同拉曼峰或指纹区内重叠繁杂的拉曼峰进行区分。可以采用不同调制手段对SRS进行技术更新^[49]。

可见,相较于拥挤重叠的荧光通道,SRS的分子振动通道成像提供了窄峰宽的优势,可提供的检测通道数也大大增加。然而,与常规的荧光免疫染色相比,拉曼散射截面(Raman scattering cross-section)远小于荧光染料所能达到的染色效率^[50],因此,使用普通的Carbow探针对细胞进行染色效果并不明显。为增强拉曼信号强度,除了使用SRS加快成像速度以外,还需要增加Carbow探针的浓度。闵玮课题组采用了一种将聚苯乙烯材料制成的纳米粒子与Carbow探针非共价结合的方式,依靠两种材料的疏水性与独特的溶胀吸附方式将几千个Carbow探针包裹于纳米颗粒之内,进而使纳米粒子极小尺寸(约20 nm)与聚集在纳米粒子中Carbow探针高浓度的优势结合,进而达到皮摩级的SRS光学检测尺度^[51]。

闵玮课题组^[52]采用溶胀扩散法,将具有疏水性的聚苯乙烯纳米粒子加入到含有四氢呋喃(tetrahydrofuran, THF)的溶液中,纳米粒子发生膨胀使Carbow探针能够扩散到粒子内部。之后,再通过补充过量的水使纳米粒子收缩为原始尺寸,进而使Carbow

探针封闭在粒子内部。通过这一方法,极大地降低了探针与纳米粒子结合的复杂性,进一步简化了相关实验操作^[53]。经过验证,Carbow纳米粒子的亮度高于普通Carbow探针两到三个数量级。为到达特异性的细胞染色目的,通过EDC/NHS偶联化学反应,将纳米粒子表面上的羧基与端基连接氨基与羟基的由多个聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)聚合而成化学链进行连接,进而将不同的二抗与聚乙二醇链的羧基相连,借助这种组合加强抗体抗原的特异性结合强度以支持对亚细胞结构进行染色^[12]。通过使用多种Carbow探针分子与不同的一抗进行孵育,二抗结合,借助SRS显微技术成功对Cos-7细胞中的 α -微管蛋白、波形蛋白与肌动蛋白进行标记,获得了微管、微丝与中间丝在细胞中的位置信息。除此之外,将细胞骨架的三色SRS成像与使用NucGreen对细胞核进行的荧光染色成像进行通道结合,结果发现各通道亮度正常、分布均匀且没有荧光染料的干扰。同时,基于结合荧光二抗的结果,可以得到:SRS观察到的Carbow纳米粒子的染色结果与荧光结果具有良好的相关性。这充分说明了Carbow在光学成像中的多通道优势以及在细胞染色过程中的可靠性与应用潜力^[53]。

在复杂体系中获得高分辨率信息,需要在了解组织体系的结构功能的基础上得到样品的全局信息,组织免疫染色提供了一条探测组织结构与生理功能的完整路径^[54]。在组织免疫实验样本中,介导特定的细胞间黏附相连的细胞膜相关糖蛋白:上皮钙黏蛋白(E-cadherin)被选择,其特异性在于仅在上皮细胞中表达^[55]。为验证Carbow在组织免疫染色过程中的灵敏性与特异性,采用常规的免疫荧光染色与Carbow2220介导的免疫染色作为对照。结果显示,在小鼠的结肠组织切片中,与荧光免疫染色等结果一致,Carbow免疫染色仅能在靠近管腔的上皮细胞中显示上皮钙黏细胞的染色模式,而在周围的结缔组织等部分并未观察到染色结果。同时,这也与上皮钙黏蛋白在细胞中的亚定位分布呈现相同预期^[31]。可见,Carbow结合纳米粒子在组织样品中可以达到良好的特异性。除了使用Carbow探针结合纳米粒子,北京大学汤新景课题组^[56]研发的拉曼纳米粒子采用具有独特振动频率的炔烃和叠氮化物等标记物作为纳米粒子内的高密度信号源,结合新型纳米材料极适用于活细胞的拉曼高光谱检测与成像。通过对纳米粒子进行表面修饰靶向不同受体,功能化的纳米载体与多色高灵敏度拉曼探针可用于肿瘤组织靶向成像与拉曼光谱检测。

4.3 细胞分选与高通量分析

除了用于多通道光学成像,Carbow也可以凭借其高灵敏性与特异性用于分子与细胞功能的高通量数据分析。为加强数据存储强度,具有生物亲和性与超小尺寸的纳米粒子被用于Carbow的信息载体^[57]。通过将Carbow非共价掺杂聚合物纳米粒子以制备超亮纳米颗粒,根据收集的拉曼光谱信息并按照同一振动频率下的拉曼强度值大小的不同,将每个强度数据量化为0、1和2等不同的数字表达方式。因此,根据自发拉曼光谱下的10个不同振动频率结合3种不同的强度变化值,在SRS窄光谱不存在串扰的优势下,可以得到 $3^{10}-1$ 即59 048种不同的排列组合,这些组合用于光学记录即可成为数据并转化为被测量物质的光谱条形码^[31]。

在细胞分选过程中,不同的编码组合可以用来标记每一个细胞,而细胞吸收Carbow纳米粒子的能力可以达到3个数量以上。以细胞同时吸收3个纳米粒子为例,编码组合就可以扩大到 3^{13} 个,如此庞大的光学条形码数量远超现在所能使用的任何

有机染料或普通纳米粒子等常用的分选技术方法。同时,这些条形码足以编码包括人体在内的多个体系中的所有细胞。因此,使用Carbow纳米粒子用于体外检测、细胞分选与高通量分析已经成为值得关注的前沿技术。除此之外,相比于荧光细胞分选和快速无标记SRS分选^[58]等方式,Carbow、纳米粒子与SRS技术的结合提供了高可分辨频率以及超多编码的优势,同时消除了荧光能量转移与光漂白等问题的影响。

在高通量活细胞分析与表型分析中,Carbow纳米粒子拉曼探针组凭借极强的信号与高可分辨性可以对单细胞多参数数据进行测量。通过采用不同抗体对Carbow纳米粒子表面进行功能化,接着与全细胞自发拉曼光谱数据进行耦合,依靠14个表面功能化的Carbow探针对单个活细胞的表面蛋白表达水平、内吞作用机制与代谢动力学等进行量化。在药物作用分析中,通过Carbow纳米粒子对多种化疗试剂进行标记,通过对使用化疗试剂不同处理情况下的人乳腺癌细胞进行测量,对比已报告的文献结论,全细胞拉曼光谱信息得到的结果一致并进一步获得了如化疗药物对线粒体膜电位具有变化作用等新结论^[59]。

综上所述,Carbow在结合表面功能化的纳米粒子后,不仅可以对特定的蛋白进行标记,还可以在单细胞高通量测量领域,对生物系统中的复杂细胞功能与分子结构进行高通量分析,为药物作用多参数分析提供有效工具以及联用活细胞流式细胞仪等进行多路复用测量与聚类网络分析。

5 展望

SRS作为一种免标记显微成像技术,凭借良好的成像速度与非共振背景,在材料、化工与生物医学等领域已有广泛的应用^[60-61]。近年来,拉曼探针的开发与应用进一步提升了SRS显微成像的灵敏度与特异性。Carbow作为新型的多色拉曼探针,是具有多个特异化学基团的多炔链,利用拉曼静默区以及窄光谱的优势可对细胞内不同物质进行超复用多通道的特异光学成像。

在常规拉曼探针标记中,采用掺杂炔烃或稳定同位素的类似物标记如Edu等在生物成像过程中仍存在可分辨程度低与化学合成复杂等劣势,普通拉曼探针虽然拉曼信号强但是也存在成像通道数量少

的不足。一方面, Carbow探针通过将多个具有高拉曼强度的外源化学键进行共轭形成多炔链分子, 使所得到的拉曼信号得到极大的增强, 亮度也大大提升。另一方面, Carbow在化学合成过程中通过采用在端基预留氨基甲酸酯接头以便于后续连接不同化学基团的方式, 增加了生物学应用的普适性, 减少了针对不同亚细胞结构以重新合成靶向探针的成本。

在植物学领域, 植物细胞壁成分结构与类型研究是当前的热点与难点, 密歇根州立大学的丁士友教授及其团队^[62]通过双色SRS显微镜成功得到了木质素和植物多糖的分布与含量信息, 这对细胞壁成分与组装机理解析具有重要意义。高光谱SRS在对木质素化学结构分析研究中取得了对多种官能团如醛、醇和芳环等在不同时期细胞壁中的分布与浓度信息的成果, 并对木质素醛还原为醇的过程进行实时监测^[22]。尽管成功得到了木质素官能团的定量定性分析结果, 然而成像分辨率能力和特异性程度仍有待提高, 木质素类型也无法准确鉴定。而Carbow探针分子的开发, 对细胞壁合成过程中多种大分子物质如纤维素、半纤维素、果胶和木质素等进行标记, 对细胞壁组装过程进行可视化分析将成为新的研究重点。虽然目前使用多色拉曼探针在解决植物高聚物不同单体构型与组装过程的区分与标记研究方面还处于起步阶段, 但是拉曼标记成像已经在动物、微生物以及癌症研究领域取得了重大进展, 这为未来的植物拉曼标记研究奠定了基础, SRS拉曼标记技术如Carbow等在植物领域将会有更深的推进和更广泛的应用。

参考文献 (References)

- [1] RAMAN C V. A change of wave-length in light scattering [J]. *Nature*, 1928, 121(3051): 619.
- [2] YAN S, CUI S, KE K, et al. Hyperspectral stimulated Raman scattering microscopy unravels aberrant accumulation of saturated fat in human liver cancer [J]. *Anal Chem*, 2018, 90(11): 6362-6.
- [3] SULTAN M, SCHULZ M H, RICHARD H, et al. A global view of gene activity and alternative splicing by deep sequencing of the human transcriptome [J]. *Science*, 2008, 321(5891): 956-60.
- [4] 敖建鹏, 黄静, 季敏标. 受激拉曼散射显微技术及其应用[J]. *激光与光电子学进展*(AO J P, HUANG J, JI M B. Stimulated Raman scattering microscopy and its applications [J]. *Laser & Optoelectronics Progress*), 2022, 59(4): 9-27.
- [5] HU F, SHI L, MIN W. Biological imaging of chemical bonds by stimulated Raman scattering microscopy [J]. *Nat Methods*, 2019, 16(9): 830-42.
- [6] LEE H J, CHENG J. Imaging chemistry inside living cells by stimulated Raman scattering microscopy [J]. *Methods*, 2017, 128: 119-28.
- [7] AO J, FANG X, MIAO X, et al. Switchable stimulated Raman scattering microscopy with photochromic vibrational probes [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 3089.
- [8] WEI L, YU Y, SHEN Y, et al. Vibrational imaging of newly synthesized proteins in live cells by stimulated Raman scattering microscopy [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(28): 11226-31.
- [9] ALFONSO-GARCIA A, PFISTERER S G, RIEZMAN H, et al. D38-cholesterol as a Raman active probe for imaging intracellular cholesterol storage [J]. *J Biomed Opt*, 2016, 21(6): 61003.
- [10] EPSTEIN S C, HUFF A R, WINESETT E S, et al. Tracking carrier protein motions with Raman spectroscopy [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 2227.
- [11] WEI L, HU F, SHEN Y, et al. Live-cell imaging of alkyne-tagged small biomolecules by stimulated Raman scattering [J]. *Nat Methods*, 2014, 11(4): 410-2.
- [12] MIAO Y, SHI L, HU F, et al. Probe design for super-multiplexed vibrational imaging [J]. *Phys Biol*, 2019, 16(4): 41003.
- [13] LO A, CLÉON G, VERVISCH P, et al. Spontaneous Raman scattering: a useful tool for investigating the afterglow of nanosecond scale discharges in air [J]. *Applied Physics B*, 2012, 107(1): 229-42.
- [14] 张博涵, 郭莉, 姚冽, 等. 受激拉曼散射显微技术用于快速无标记病理成像[J]. *中国激光*(ZHANG B H, GUO L, YAO L, et al. Rapid histological imaging using stimulated Raman scattering microscopy [J]. *Chinese Journal of Lasers*), 2020, 47(2): 242-55.
- [15] BHARGAVA R. Infrared spectroscopic imaging: the next generation [J]. *Appl Spectrosc*, 2012, 66(10): 1091-120.
- [16] DEAN K M, PALMER A E. Advances in fluorescence labeling strategies for dynamic cellular imaging [J]. *Nat Chem Biol*, 2014, 10(7): 512-23.
- [17] 陈涛, 虞之龙, 张先念, 等. 相干拉曼散射显微术[J]. *中国科学: 化学*(CHEN T, YU Z L, ZHANG X N, et al. Coherent Raman scattering microscopy [J]. *Science China Chemistry*), 2012, 42(1): 1-16.
- [18] LIN P, CHEN W T, YOUSEF K M A, et al. Coherent Raman scattering imaging with a near-infrared achromatic metalens [J]. *APL Photonics*, 2021, 6(9): 96107.
- [19] 满奕, 李昂, 曹德昌, 等. 受激拉曼散射显微技术在生物科学中的应用[J]. *电子显微学报*(MAN Y, LI A, CAO D C, et al. Application of stimulated Raman scattering microscopy in biological sciences [J]. *Journal of Chinese Electron Microscopy Society*), 2015, 34(2): 154-62.
- [20] BEIER H T, NOOJIN G D, ROCKWELL B A. Stimulated Raman scattering using a single femtosecond oscillator with flexibility for imaging and spectral applications [J]. *Opt Express*, 2011, 19(20): 18885-92.
- [21] ZHANG L, WU Y, ZHENG B, et al. Rapid histology of laryngeal squamous cell carcinoma with deep-learning based stimulated Raman scattering microscopy [J]. *Theranostics*, 2019, 9(9): 2541-54.
- [22] LIU B, WANG P, KIM J I, et al. Vibrational fingerprint mapping reveals spatial distribution of functional groups of lignin in plant cell wall [J]. *Anal Chem*, 2015, 87(18): 9436-42.

- [23] WANG L, XING X, ZENG X, et al. Spatially resolved isotope tracing reveals tissue metabolic activity [J]. *Nat Methods*, 2022, 19(2): 223-30.
- [24] WEI L, SHEN Y, XU F, et al. Imaging complex protein metabolism in live organisms by stimulated Raman scattering microscopy with isotope labeling [J]. *ACS Chem Biol*, 2015, 10(3): 901-8.
- [25] SHI L, SHEN Y, MIN W. Invited article: visualizing protein synthesis in mice with *in vivo* labeling of deuterated amino acids using vibrational imaging [J]. *APL Photonics*, 2018, 3(9): 92401.
- [26] PASCUT F C, COUVREUR V, DIETRICH D, et al. Non-invasive hydrodynamic imaging in plant roots at cellular resolution [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 4682.
- [27] ANDERSON C T, WALLACE I S, SOMERVILLE C R. Metabolic click-labeling with a fucose analog reveals pectin delivery, architecture, and dynamics in *Arabidopsis* cell walls [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(4): 1329-34.
- [28] YAMAKOSHI H, DODO K, PALONPON A, et al. Alkyne-Tag Raman imaging for visualization of mobile small molecules in live cells [J]. *J Am Chem Soc*, 2012, 134(51): 20681-9.
- [29] CHEN Y, REN J, ZHANG X, et al. Alkyne-modulated surface-enhanced Raman scattering-palette for optical interference-free and multiplex cellular imaging [J]. *Anal Chem*, 2016, 88(12): 6115-9.
- [30] TIAN S, LI H, LI Z, et al. Polydiacetylene-based ultrastrong bioorthogonal Raman probes for targeted live-cell Raman imaging [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 81.
- [31] HU F, ZENG C, LONG R, et al. Supermultiplexed optical imaging and barcoding with engineered polyynes [J]. *Nat Methods*, 2018, 15(3): 194-200.
- [32] SALEHI M, STEINIGEWEG D, STRÖBEL P, et al. Rapid immuno-SERS microscopy for tissue imaging with single-nanoparticle sensitivity [J]. *J Biophotonics*, 2013, 6(10): 785-92.
- [33] HU F, BRUCKS S D, LAMBERT T H, et al. Stimulated Raman scattering of polymer nanoparticles for multiplexed live-cell imaging [J]. *Chem Commun*, 2017, 53(46): 6187-90.
- [34] LI M, WU J, MA M, et al. Alkyne- and nitrile-anchored gold nanoparticles for multiplex SERS imaging of biomarkers in cancer cells and tissues [J]. *Nanotheranostics*, 2019, 3(1): 113-9.
- [35] ARTUR C G, WOMACK T, ZHAO F, et al. Plasmonic nanoparticle-based expansion microscopy with surface-enhanced Raman and dark-field spectroscopic imaging [J]. *Biomed Opt Express*, 2018, 9(2): 603.
- [36] 孙丽娟, 马可婧, 张军伟, 等. 复合磁性纳米粒子 $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2-Ag$ 的制备以及在表面增强拉曼光谱中的应用[J]. *电子显微学报*(SUN L J, MA K J, ZHANG J W, et al. Preparation and applications in SERS of $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2-Ag$ magnetic nanoparticles [J]. *Journal of Chinese Electron Microscopy Society*), 2020, 39(6): 694-701.
- [37] CASARI C S, TOMMASINI M, TYKWINSKI R R, et al. Carbon-atom wires: 1-D systems with tunable properties [J]. *Nanoscale*, 2016, 8(8): 4414-35.
- [38] WEI L, CHEN Z, SHI L, et al. Super-multiplex vibrational imaging [J]. *Nature*, 2017, 544(7651): 465-70.
- [37] LUU T, ELLIOTT E, SLEPKOV A D, et al. Synthesis, structure, and nonlinear optical properties of diarylpolyynes [J]. *Org Lett*, 2005, 7(1): 51-4.
- [39] LONG R, ZHANG L, SHI L, et al. Two-color vibrational imaging of glucose metabolism using stimulated Raman scattering [J]. *Chem Commun*, 2018, 54(2): 152-5.
- [40] 闵玮, 杨驰, 王平. 生物医学中的化学成像: 光学显微镜的下一个研究前沿[J]. *光学与光电技术*(MIN W, YANG C, WANG P. Chemical imaging in biomedicine: the next research frontier in light microscopy [J]. *Optics & Optoelectronic Technology*), 2020, 18(4): 1-11.
- [41] SHEN W, MA L, ZHANG X, et al. Three-dimensional reconstruction of *Picea wilsonii Mast.* Pollen grains using automated electron microscopy [J]. *Sci China Life Sci*, 2020, 63(2): 171-9.
- [42] ZHANG X, MAN Y, ZHUANG X, et al. Plant multiscale networks: charting plant connectivity by multi-level analysis and imaging techniques [J]. *Sci China Life Sci*, 2021, 64(9): 1392-422.
- [43] 钱虹萍, 林金星, 崔亚宁. 固醇合成途径关键基因SMT2、SMT3在植物免疫中的功能研究[J]. *电子显微学报*(QIAN H P, LIN J X, CUI Y N. Function analysis of key genes SMT2 and SMT3 of sterol synthesis pathway in plant immunity [J]. *Journal of Chinese Electron Microscopy Society*), 2021, 40(2): 170-7.
- [44] 马灵玉, 王广超, 张曦, 等. 拟南芥子叶发育过程中叶绿体特征的量化及分布分析[J]. *电子显微学报*(MA L Y, WANG G C, ZHANG X, et al. Quantification and distribution analysis of cotyledonal chloroplasts during seeding development in *Arabidopsis* [J]. *Journal of Chinese Electron Microscopy Society*), 2021, 40(3): 270-8.
- [45] CUI Y, ZHANG X, YU M, et al. Techniques for detecting protein-protein interactions in living cells: principles, limitations, and recent progress [J]. *Sci China Life Sci*, 2019, 62(5): 619-32.
- [46] ZAQOUT S, BECKER L, KAINDL A M. Immunofluorescence staining of paraffin sections step by step [J]. *Front Neuroanat*, 2020, 14: 582218.
- [47] SHI L, WEI M, MIAO Y, et al. Highly-multiplexed volumetric mapping with Raman dye imaging and tissue clearing [J]. *Nat Biotechnol*, 2022, 40(3): 364-73.
- [48] XIONG H, SHI L, WEI L, et al. Stimulated Raman excited fluorescence spectroscopy and imaging [J]. *Nat Photonics*, 2019, 13(6): 412-7.
- [49] WEI M, SHI L, SHEN Y, et al. Volumetric chemical imaging by clearing-enhanced stimulated Raman scattering microscopy [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116(14): 6608-17.
- [50] HU F, CHEN Z, ZHANG L, et al. Vibrational imaging of glucose uptake activity in live cells and tissues by stimulated Raman scattering [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2015, 54(34): 9821-5.
- [51] KAIRDOLF B A, QIAN X, NIE S. Bioconjugated nanoparticles for biosensing, *in vivo* imaging, and medical diagnostics [J]. *Anal Chem*, 2017, 89(2): 1015-31.
- [52] ZHAO Z, CHEN C, WEI S, et al. Ultra-bright Raman dots for multiplexed optical imaging [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 2122.
- [53] LEE J, GOMEZ I J, SITTELE V B, et al. Dye-labeled polystyrene latex microspheres prepared via a combined swelling-diffusion technique [J]. *J Colloid Interface Sci*, 2011, 363(1): 137-44.
- [54] CHUNG K, WALLACE J, KIM S, et al. Structural and molecular interrogation of intact biological systems [J]. *Nature*, 2013, 497(7449): 332-7.
- [55] VAN ROY F, BERX G. The cell-cell adhesion molecule E-

- cadherin [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2008, 65(23): 3756-88.
- [56] JIN Q, FAN X, CHEN C, et al. Multicolor amaranth beads for multiplexed tumor cell and tissue imaging and *in vivo* tumor spectral detection [J]. *Anal Chem*, 2019, 91(6): 3784-9.
- [57] KAIRDOLF B A, QIAN X, NIE S. Bioconjugated nanoparticles for biosensing, *in vivo* imaging, and medical diagnostics [J]. *Anal Chem*, 2017, 89(2): 1015-31.
- [58] SUZUKI Y, KOBAYASHI K, WAKISAKA Y, et al. Label-free chemical imaging flow cytometry by high-speed multicolor stimulated Raman scattering [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116(32): 15842-8.
- [59] CHEN C, ZHAO Z, QIAN N, et al. Multiplexed live-cell profiling with Raman probes [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 3405.
- [60] SHI L, KLIMAS A, GALLAGHER B, et al. Super-resolution vibrational imaging using expansion stimulated Raman scattering microscopy [J]. *Adv Sci*, 2022, 9(20): 2200315.
- [61] FREUDIGER C W, MIN W, HOLTOM G R, et al. Highly specific label-free molecular imaging with spectrally tailored excitation-stimulated Raman scattering (STE-SRS) microscopy [J]. *Nat Photonics*, 2011, 5(2): 103-9.
- [62] DING S Y, LIU Y S, ZENG Y, et al. How does plant cell wall nanoscale architecture correlate with enzymatic digestibility [J]? *Science*, 2012, 338(6110): 1055-60.