

基于点击化学的同步辐射 X 射线成像标签^{*}

汤乔伟^{†,a,d,f} 蔡小青^{†,a,e,f} 殷大鹏^{†,a,f} 孔华庭^e 张祥志^e

张继超^e 闫庆龙^d 诸颖^{*,a,b,f} 樊春海^{*,c}

(^a中国科学院上海应用物理研究所 中国科学院微观界面物理与探测重点实验室 上海 201800)

(^b上海大学理学院化学系 材料生物学研究所 上海 200444)

(^c上海交通大学化学化工学院 上海 200025)

(^d祥符实验室 嘉善 314102)

(^e中国科学院上海高等研究院 基础交叉研究中心 上海同步辐射光源 张江实验室 上海 201210)

(^f中国科学院大学 北京 100049)

摘要 基于同步辐射的 X 射线显微成像技术具有高空间分辨率和良好的能量(元素)分辨能力,在细胞内生物分子的识别和成像中具有很大的应用潜力。然而,目前已发展的与同步辐射 X 射线显微技术相适合的对细胞内多种生命靶标同时进行识别与成像的探针技术仍较缺乏。本工作应用 X 射线具有良好的能量分辨、且元素谱间互不干扰的特点,可控合成聚多巴胺(PDA)纳米颗粒,在 PDA 纳米颗粒上修饰叠氮基并螯合金属离子,发展了基于点击化学的同步 X 射线成像标签(PDA-N₃-Metal),并以 30 nm 的成像分辨率对该标签进行同步辐射 X 射线成像。研究结果为进一步制备基于点击化学的 X 射线探针,实现同时对细胞内多种生物分子的特异性识别和成像打下了良好的基础。

关键词 聚多巴胺;点击化学;同步 X 射线;金属;成像标签

Click Chemistry-based Synchrotron X-ray Imaging Tags^{*}

Tang, Qiaowei^{†,a,d,f} Cai, Xiaoqing^{†,a,e,f} Yin, Dapeng^{†,a,f} Kong, Huating^e Zhang, Xiangzhi^e
Zhang, Jichao^e Yan, Qinglong^d Zhu, Ying^{*,a,b,f} Fan, Chunhai^{*,c}

(^a Key Laboratory of Interfacial Physics and Technology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai Institute of Applied Physics, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201800)

(^b Institute of Materials Biology, Department of Chemistry, College of Science, Shanghai University, Shanghai 200444)

(^c School of Chemistry and Chemical Engineering, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200025)

(^d Xiangfu Laboratory, Jiashan 314102)

(^e The Interdisciplinary Research Center, Shanghai Synchrotron Radiation Facility, Zhangjiang Laboratory, Shanghai Advanced Research Institute, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201210)

(^f University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049)

Abstract One of the basic goals of cell biology is to identify multiple biological molecules within cells and understand the complex interactions between biological molecules in cellular life activities. Synchrotron-based X-ray microscopy has high spatial resolution and good energy (element) resolution, which has great application potential in the recognition and imaging of intracellular biomolecules. At present, the probes that have been developed for synchrotron-based X-ray microscopy are mainly immunostaining probes and genetic labeling probes. Immunostaining probes are prone to lead to cross-reactions due to their dependence on antigen-antibody reactions. The genetic labeling probes, based on gene coding tags, catalyze the generation of X-ray sensitive polymers. However, the polymers used to provide X-ray imaging signals have no fixed morphology. When it is applied to cell imaging, the positioning accuracy will be reduced due to the diffusion of tags in cells, which is an inherent defect of such imaging tags. In addition, there are few existing systems that can express each other independently and step by step for this type of probe. Therefore, both types of X-ray probes mentioned above are difficult to achieve simultaneous high-resolution imaging observation of multiple biological target molecules in cellular life activities. In this research

^{*} Dedicated to the 90th anniversary of *Acta Chimica Sinica*.

^{*} E-mail: zhuying@sinap.ac.cn, fanchunhai@sjtu.edu.cn

[†] 汤乔伟、蔡小青、殷大鹏为本文共同第一作者

Received March 2, 2023; published April 11, 2023.

Project supported by the National Key Research and Development Program of China (No. 2022YFA1603600), the National Natural Science Foundation of China (Nos. 22022410, 82050005), 2022 Shanghai "Science and Technology Innovation Action Plan" Fundamental Research Project (22JC1401203) and the Youth Innovation Promotion Association CAS (No. 2016236).

^{*} 庆祝《化学学报》创刊 90 周年。

项目受国家重点研发计划(No. 2022YFA1603600)、国家自然科学基金(Nos. 22022410, 82050005)、上海市 2022 年度“科技创新行动计划”基础研究领域项目(22JC1401203)和中科院青年创新促进会(No. 2016236)资助。

paper, by using the characteristics of X-ray that has good energy resolution and does not interfere with each other between element spectra, we can synthesize polydopamine (PDA) nanoparticles in a controlled manner, modify azide groups on PDA nanoparticles and chelate metal ions, develop a click chemistry based synchronous X-ray imaging tag (PDA-N₃-Metal), and conduct synchrotron radiation X-ray imaging on the tag with an imaging resolution of 30 nm. The research results lay a good foundation for further preparation of X-ray probes based on click chemistry, and for realizing the specific recognition and imaging of multiple biological molecules in cells at the same time.

Keywords polydopamine; click chemistry; synchrotron-based X-ray; metal; imaging tag

1 引言

细胞生物学的基本目标之一是识别细胞内的多种生物分子,理解细胞生命活动中生物分子间复杂的相互作用。因为X射线的波长很短,同步辐射X射线显微成像(XRM)非常适合对细胞开展纳米分辨成像分析^[1]。

XRM还显示了几个特征^[2-6]。(1)与电子束相比,X射线具有更高的穿透深度,能够不经过切片对完整细胞进行成像;(2)XRM可以提供细胞形态的高衬度成像,这在超分辨荧光显微术下不容易实现;(3)特别是,XRM提供了出色的能量分辨率,允许同时进行多种金属元素的特征光谱识别。基于此,可以开发多色标签应用于制备生物探针,实现对细胞内多种生物分子的识别和成像。

目前已发展的与同步辐射X射线显微技术相适合的探针主要有免疫染色探针和遗传标记探针两大类。免疫染色探针主要是应用X射线对金属纳米颗粒的特征吸收,在纳米颗粒上连接抗体从而对特定生物分子进行识别并成像,具有特异性高和敏感性强的优势^[7]。但由于其依赖抗原抗体反应,反应间极易出现串扰^[8]。遗传标记探针基于基因编码标签,催化X射线敏感的聚合物生成,但用于提供X射线成像信号的聚合物没有固定的形貌,后续应用到细胞成像时会因标签在细胞内的扩散而导致定位精度降低,这是这类成像标签固有的一大缺陷^[9]。此外,适用于该类探针现有的能够相互独立分步表达的体系较少:例如光催化的迷你单线态氧产生蛋白(MiniSOG)和工程化抗坏血酸过氧化物酶(APEX2)催化生成二氨基联苯胺(DAB)与金属的聚合物^[1]。因此上述两类X射线探针均很难实现对细胞生命活动中多种生物靶标分子的同时高分辨成像观测。

21世纪初,Sharpless等开创了点击化学,通过小单元的拼接来快速完成形形色色分子的化学合成^[10-11],并具有操作简单、灵活高效等特点^[12]。近年来,点击化学在细胞生物学研究中被广泛应用,已实现对细胞内聚糖、蛋白、脱氧核糖核酸(DNA)和核糖核酸(RNA)等多种生物分子的识别和荧光成像^[13-15]。

在本工作中,我们发展了基于点击化学的同步辐射X射线成像标签。利用聚多巴胺(PDA)纳米颗粒的金属离子螯合特性和表面功能化修饰^[16],我们可控合成了不同粒径大小的PDA纳米颗粒,并在其上修饰叠氮基用于点击反应。同时PDA纳米颗粒螯合了不同的金属元素用于提供X射线差异性信号,我们在30 nm分辨率

下成功实现了对修饰叠氮基的聚多巴胺-金属(PDA-N₃-Metal)的同步辐射X射线成像(图1)。研究结果为进一步制备基于点击化学的X射线探针,将其应用于纳米分辨细胞成像领域打下了良好的基础。

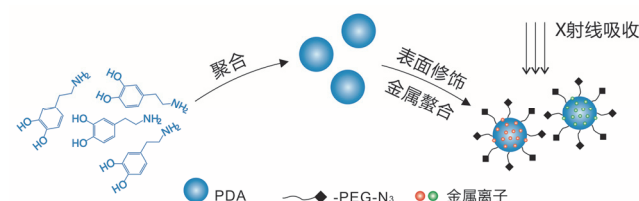


图1 PDA纳米颗粒经修饰叠氮基和螯合金属离子生成基于同步辐射X射线的成像标签示意图

Figure 1 Schematic showing of the PDA nanoparticles modified with azide and chelated metal ions as a synchrotron X-ray imaging tags

2 结果与讨论

2.1 可控合成不同粒径的PDA纳米颗粒

多巴胺(dopamine), 3,4-二羟基苯乙胺,是模仿贻贝足黏液蛋白中的多巴结构^[17],它在碱性溶液中可以发生自聚合反应,由此产生的PDA可以沉积在无机和有机表面,包括贵金属、氧化物、聚合物、半导体和陶瓷等表面^[18-19]。PDA纳米颗粒主要有三种合成方法,包括电聚合、酶促氧化法和溶液氧化法^[20]。在此我们选择使用盐酸多巴胺在弱碱性溶液中氧化自聚合成PDA纳米颗粒。

在透射电子显微镜下对PDA纳米颗粒进行成像。我们发现在其它试剂量固定的前提下,通过调节氨水的使用量,可以调节PDA纳米颗粒的大小(表1),且氨水的使用量越多,PDA纳米颗粒的粒径越小。电镜下的观测结果表明PDA纳米颗粒的形状均匀,且单分散性良好,未形成大面积的聚集。不同粒径的PDA纳米颗粒为其应用于不同场景打下了良好的基础。若将该标签进一步开发成基于点击化学的同步辐射成像探针,则可根据不同的生物靶标,选择不同粒径的PDA纳米颗粒作为内核,从而提升定位精度,更好地应用于多种场景。

表1 氨水对PDA纳米颗粒粒径的影响

Table 1 Effect of ammonia on particle size of the PDA nanoparticles

28%氨水的 使用量	0.4 mL	0.6 mL	1 mL	1.5 mL	2 mL
PDA 纳米 颗粒的粒径	762.5 ± 92.3 nm	507.6 ± 59.4 nm	283.5 ± 37.3 nm	177.0 ± 25.7 nm	136.9 ± 21.0 nm

2.2 PDA 纳米颗粒修饰叠氮基及螯合金属离子

PDA 结构中含有大量的邻苯二酚和一、二级胺, 从而有助于提高 PDA 的粘附性并可进行一系列的表面改性. 硫醇和胺可通过迈克尔加成或希夫碱反应结合到 PDA 纳米颗粒的表面, 从而为 PDA 纳米颗粒赋予更多的反应特性^[21]. 基于此性质, 我们通过 PDA 纳米颗粒与叠氮-聚乙二醇-胺的反应为 PDA 纳米颗粒表面修饰了叠氮基.

PDA 纳米颗粒表面丰富的特征基团和其较易的表面功能化修饰为金属离子的螯合提供了充足的位点. PDA 此类有机纳米颗粒, 具有较好的生物相容性, 但在一些成像模式例如 PET(正电子发射型计算机断层显像)下, 未有较好的衬度. 虽然在同步辐射 X 射线下, PDA 纳米颗粒具有一定的衬度, 但欲提高衬度或者进一步实现多色成像, 在其上螯合金属是较佳的选择.

我们分别在 PDA-N₃ 溶液中加入含 Cu²⁺ 和 Fe²⁺ 的缓冲溶液, 以在 PDA-N₃ 上螯合 Cu 和 Fe, 获得 PDA-N₃-Cu 和 PDA-N₃-Fe. 在电镜下对 PDA-N₃-Cu 和 PDA-N₃-Fe 进行观测(图 2a, 2c), 并做能量散射谱(EDS)分析(图 2b, 2d). 结果显示, PDA-N₃-Cu 和 PDA-N₃-Fe 形状均匀, 能谱分析的结果表明, PDA 纳米颗粒上可观测到 Cu 和 Fe 的信号峰. 这说明 PDA 纳米颗粒具有良好的金属离子螯合能力, 可为进一步的同步 X 射线成像提供信号.

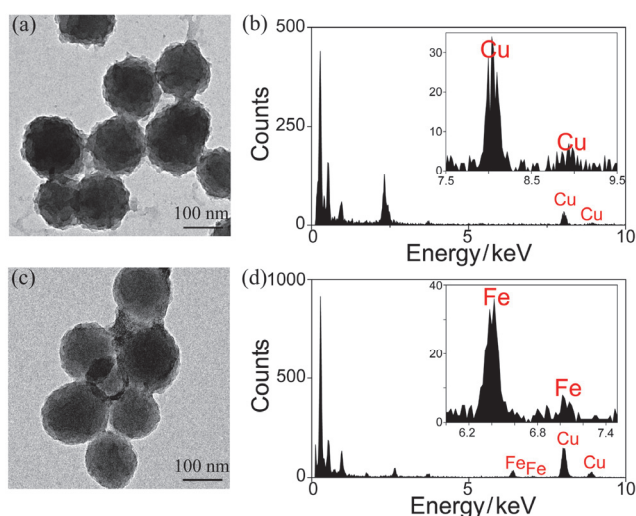


图 2 PDA-N₃-Cu (a, b) 和 PDA-N₃-Fe (c, d) 的电镜成像及能谱
Figure 2 Electron microscopy imaging and energy spectrum of PDA-N₃-Cu (a, b) and PDA-N₃-Fe (c, d)

2.3 同步 X 射线成像

第三代高亮度的同步辐射光源具有宽波段、窄脉冲和高准直等性质, 其中的 X 射线波段衍生出了一系列成像和分析方法. X 射线与物质间会发生丰富的辐射-物质相互作用, 结合同步辐射 X 射线本身高通量等性质, 使得同步辐射 X 射线具有优秀的元素分辨能力.

在此我们选择了软 X 射线双能衬度成像对元素分布进行分析, 其原理是在样品内需标识元素的吸收边附

近的两个能量处分别对样品进行成像, 通过计算两幅图像的光密度, 得到相比双能图像^[22]. 该图像可展现元素的空间分布信息. 我们分别在 938.8 eV 和 942.8 eV 能量处以 30 nm 的分辨率对 180 nm (图 3a, 3b) 和 300 nm (图 3d, 3e) 两种粒径的 PDA-N₃-Cu 进行成像, 并分别获得了它们的 X 射线双能图像(图 3c, 3f), 以及 Cu 元素在样品上的分布情况. 结果表明, Cu 信号均匀分布在 PDA 纳米颗粒上且具有良好的 X 射线吸收特性, 说明 PDA-N₃-Cu 可以作为同步 X 射线成像标签用于进一步的基于点击化学的成像探针设计及细胞成像研究.

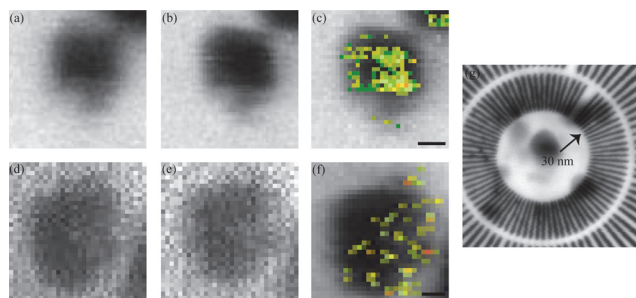


图 3 PDA-N₃-Cu 在 X 射线能量为 938.8 eV (a, d) 和 942.8 eV (b, e) 的图像和双能图像(c, f)以及星形标准靶的 X 射线成像(g). 比例尺: 100 nm

Figure 3 Images of PDA-N₃-Cu at X-ray energies of 938.8 eV (a, d) and 942.8 eV (b, e) and dual-energy images (c, f). X-ray imaging of a test star pattern sample (g). Scale: 100 nm

3 结论

理解生物分子在细胞生命活动中复杂的相互作用离不开显微成像技术的支持, 得益于荧光标记技术与荧光显微成像技术的发展, 生物分子示踪得以实现, 为细胞生命活动的研究提供了强有力的手段. 由于阿贝极限的存在, 传统荧光成像技术难以实现 100 nm 以下的显微成像, 但生物分子和亚细胞结构恰好落在该范围内^[23]. 虽然近些年来发展了受激辐射损耗显微镜(Stimulated Emission Depletion Microscopy, STED)、基态损耗显微镜(Ground State Depletion Microscopy, GSD)、随机光学重建显微镜(Stochastic Optical Reconstruction Microscopy, STORM)、光活化定位显微镜/荧光活化定位显微镜(Photo-Activated Localization Microscopy/Fluorescence Photo-activated Localization Microscopy, PALM/FPALM)和结构光照明显微镜(Structured Illumination Microscopy, SIM)等一系列超分辨显微成像技术^[24-28], 但其普遍存在的较慢成像速度和难以实现对多种生物分子同时成像的问题, 限制了其在揭示细胞生命活动的应用.

基于同步辐射的 X 射线显微成像技术为纳米细胞成像领域打开新思路. 该技术的高穿透深度和纳米级分辨率为完整细胞的高分辨成像提供了先进手段, 但是已发展的与之相适合的免疫染色探针和遗传标记探针均难以实现对细胞生命活动中多种生物靶标分子的同时成像观测. 本工作通过在 PDA 纳米颗粒表面修饰叠氮

基,同时螯合不同的金属离子,结合同步辐射 X 射线优秀的元素分辨能力,成功制备了基于点击化学的同步辐射 X 射线成像标签。

我们开发的基于点击化学的同步辐射成像标签粒径可控,如果进一步制备基于点击化学的同步辐射 X 射线成像探针,预期能够解决基于催化聚合的 X 射线成像标签在细胞内容易扩散的问题,提高对不同生物靶标的定位精度。炔基修饰甘露糖(Ac₄ManNAI)和 5-乙炔基-2'脱氧尿嘧啶核苷(EdU)等常被用于在特定的生物靶标上修饰炔基,结合该标签上的叠氮基,有望实现对生物靶标的标记^[29-30]。同时由于 PDA 纳米颗粒表面还可以修饰炔基和巯基等点击化学所需基团,结合点击反应及催化体系的多样性,其可用于多种点击化学探针的制备,有望实现多种细胞生物分子的同时识别和成像,甚至脑彩虹图的成像。该工作为进一步制备基于点击化学的同步辐射 X 射线成像探针,实现对细胞内生物分子的特异性识别和成像打下了良好的基础。

4 实验部分

4.1 PDA 纳米颗粒的合成

将不同体积(0.4 mL、0.6 mL、1 mL、1.5 mL 和 2 mL)的 28%氨水溶液与 20 mL 无水乙醇和 45 mL 去离子水混合,在 30 °C 温度条件下,搅拌反应 30 min。将 250 mg 盐酸多巴胺溶于 5 mL 去离子水,注入反应液中,室温条件下反应 24 h。在 100 W 功率下超声处理 3 min,透析 3~4 次除去杂质(30 kD),得到 PDA 纳米颗粒分散液。

4.2 PDA 纳米颗粒修饰叠氮基及螯合金属离子

在 5 mL 1 mg/mL 的 PDA 溶液中加入 28%氨水,调节 pH 至 9,加入 20 mg Azide-PEG-Amine(叠氮-聚乙二醇-胺)。室温条件下搅拌反应 12 h,透析 3~4 次除去杂质(30 kD)得到修饰叠氮基的 PDA 纳米颗粒(PDA-N₃)分散液。

将 1 mL 1 mg/mL PDA-N₃ 溶液和 100 μL 10 mg/mL Fe²⁺缓冲溶液混合,40 °C 下反应 1 h。利用 PD-10 脱盐柱分离除去未反应的金属离子。得到 PDA-N₃-Fe 分散液。

将 1 mL 1 mg/mL PDA-N₃ 溶液和 100 μL 10 mg/mL Cu²⁺缓冲溶液混合,40 °C 下反应 1 h。利用 PD-10 脱盐柱分离除去未反应的金属离子。得到 PDA-N₃-Cu 分散液。

4.3 同步 X 射线成像

同步辐射 X 射线成像在上海同步辐射光源(SSRF)的 BL08U1 线站进行,实验方法为软 X 射线双能衬度成像。合成不同粒径的 PDA-N₃-Cu 并将 PDA-N₃-Cu 溶液滴在氮化硅窗上,干燥,放置在真空样品室中,选取 X 射线入射能量为 938.8 eV 和 942.8 eV。移动运动电机,完成 PDA-N₃-Cu 样品的寻找、对焦,然后进行软 X 射线成像,成像分辨率为 30 nm。

致谢

感谢上海同步辐射光源(SSRF)的同步辐射机时支持,感谢 SSRF 的 08U(BL08U1)的工作人员在测试过程中的协助以及对本工作提供的支持和帮助。

References

- [1] Kong, H. T.; Zhang, J. C.; Li, J.; Wang, J.; Shin, H. J.; Tai, R. Z.; Yan, Q. L.; Xia, K.; Hu, J.; Wang, L. H.; Zhu, Y.; Fan, C. H. *Natl. Sci. Rev.* **2020**, *7*, 1218.
- [2] Zhu, Y.; Zhang, J. C.; Li, A. G.; Zhang, Y. Q.; Fan, C. H. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2017**, *39*, 11.
- [3] Gao, J.; Gu, Z. *Natl. Sci. Rev.* **2021**, *8*, nwaa206.
- [4] Liu, Z. C.; Zhu, Y.; Zhang, L. M.; Jiang, W. P.; Liu, Y. W.; Tang, Q. W.; Cai, X. Q.; Li, J.; Wang, L. H.; Tao, C. L.; Yin, X. Z.; Li, X. W.; Hou, S. G.; Jiang, D. W.; Liu, K.; Zhou, X.; Zhang, H. J.; Liu, M. L.; Fan, C. H.; Tian, Y. *Sci. China: Chem.* **2023**, *66*, 324.
- [5] Yan, X.; Cai, X. Q.; Tang, Q. W.; Zhou, F.; Zhu, Y.; Wang, L. H.; Hu, J. *Nuclear Techniques* **2022**, *45*, 040103 (in Chinese). (燕鑫, 蔡小青, 汤乔伟, 周峰, 诸颖, 王丽华, 胡钧, 核技术, **2022**, *45*, 040103.)
- [6] Tian, T.; Zhang, J. C.; Lei, H. Z.; Zhu, Y.; Shi, J. Y.; Hun, J.; Huang, Q.; Fan, C. H.; Sun, Y. H. *Nucl. Sci. Tech.* **2015**, *26*, 030506.
- [7] Lai, H. M.; Tang, Y. M.; Lau, Z.; Campbell, R.; Yau, J.; Chan, Y.; Chan, W.; Wong, T.; Wong, H.; Yan, L.; Wu, W.; Wong, S.; Kwok, K. W.; Wing, Y. K.; Lam, H.; Ng, H. K.; Mrcic-Flogel, T.; Mok, V.; Chan, J.; Ko, H. *Nat. Methods* **2022**, *19*, 1137.
- [8] Yan, M. L.; Zuo, T. T.; Zhang, J. C.; Wang, Y. Y.; Zhu, Y.; Wang, L. H.; Zhou, Y.; Sun, Y. H. *Chem. Commun.* **2022**, *58*, 713.
- [9] Rhee, H. W.; Zou, P.; Udeschi, N. D.; Martell, J. D.; Mootha, V. K.; Carr, S. A.; Ting, A. Y. *Science* **2013**, *339*, 1328.
- [10] Kolb, H. C.; Sharpless, K. B. *Drug Discov. Today* **2003**, *8*, 1128.
- [11] Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004.
- [12] Lai, C. W.; Sun, Y.; Yang, H.; Zhang, X. Q.; Lin, B. P. *Acta Chim. Sinica* **2013**, *71*, 1201 (in Chinese). (来常伟, 孙莹, 杨洪, 张雪勤, 林保平, 化学学报, **2013**, *71*, 1201.)
- [13] Best, M. D. *Biochemistry* **2009**, *48*, 6571.
- [14] Xie, R.; Dong, L.; Du, Y. F.; Zhu, Y. T.; Hua, R.; Zhang, C.; Chen, X. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2016**, *113*, 5173.
- [15] Sawa, M.; Hsu, T.-L.; Itoh, T.; Sugiyama, M.; Hanson, S. R.; Vogt, P. K.; Wong, C.-H. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2006**, *103*, 12371.
- [16] Fan, Q. L.; Cheng, K.; Hu, X.; Ma, X. W.; Zhang, R. P.; Yang, M.; Lu, X. M.; Xing, L.; Huang, W.; Gambhir, S. S.; Cheng, Z. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 15185.
- [17] Lee, H.; Dellatore, S. M.; Miller, W. M.; Messersmith, P. B. *Science* **2007**, *318*, 426.
- [18] Qi, C.; Fu, L.-H.; Xu, H.; Wang, T.-F.; Lin, J.; Huang, P. *Sci. China: Chem.* **2019**, *62*, 162.
- [19] Huang, L.; Liu, M. Y.; Huang, H. Y.; Wen, Y. Q.; Zhang, X. Y.; Wei, Y. *Biomacromolecules* **2018**, *19*, 1858.
- [20] Liu, Y. L.; Ai, K. L.; Lu, L. H. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 5057.
- [21] Cheng, W.; Zeng, X. W.; Chen, H. Z.; Li, Z. M.; Zeng, W. F.; Mei, L.; Zhao, Y. L. *ACS Nano* **2019**, *13*, 8537.
- [22] Zhang, X. Z.; Xu, Z. J.; Zhen, X. J.; Wang, Y.; Guo, Z.; Yan, R.; Chang, R.; Zhou, R. R.; Tai, R. Z. *Acta Phys. Sin.* **2010**, *59*, 4535 (in Chinese). (张祥志, 许子健, 甄香君, 王勇, 郭智, 严睿, 常睿, 周冉冉, 邵仁忠, 物理学报, **2010**, *59*, 4535.)
- [23] Hell, S. W. *Science* **2007**, *316*, 1153.
- [24] Blom, H.; Widengren, J. *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 7377.
- [25] Göttfert, F.; Wurm, C. A.; Mueller, V.; Berning, S.; Cordes, V. C.; Honigsmann, A.; Hell, S. W. *Biophys. J.* **2013**, *105*, L01.
- [26] Samanta, S.; Gong, W.; Li, W.; Sharma, A.; Shim, I.; Zhang, W.; Das, P.; Pan, W.; Liu, L.; Yang, Z.; Qu, J.-I.; Kim, J. S. *Coord. Chem. Rev.* **2019**, *380*, 17.
- [27] Samanta, S.; He, Y.; Sharma, A.; Kim, J.; Pan, W.; Yang, Z.; Li, J.; Yan, W.; Liu, L.; Qu, J.; Kim, J. S. *Chem* **2019**, *5*, 1697.
- [28] Heintzmann, R.; Huser, T. *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 13890.
- [29] Laughlin, S. T.; Bertozzi, C. R. *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 2930.
- [30] Flors, C. J. *Microsc.* **2013**, *251*, 1.

(Cheng, B.)