



天津市科协资助出版

# 靶向生物 荧光探针制备技术

费学宁 等著



科学出版社

# 靶向生物荧光探针制备技术

费学宁 等 著

科学出版社

北 京

## 内 容 简 介

本书是关于生物荧光探针结构和设计原理、荧光探针分子的设计合成、荧光探针的生物标记技术及应用的一本专著,汇集了作者近年来在靶向生物荧光探针制备技术领域的一些主要研究成果。书中以生物荧光探针靶向标记原理为主线,系统阐述了荧光染料和功能量子点的设计合成、有机荧光染料探针分子的功能性修饰、荧光探针生物标记技术及应用等方面的科学问题及技术问题。本书内容丰富、资料翔实,内容涉及多交叉学科,为靶向生物荧光探针的构建设计、制备技术以及相关技术研究提供参考。

本书适合高等院校材料科学与工程、化学化工等专业本科生和研究生学习,对相关领域的同行也有一定的参考意义。

### 图书在版编目(CIP)数据

靶向生物荧光探针制备技术 / 费学宁等著. —北京:科学出版社,2013

ISBN 978-7-03-037160-7

I. ①靶… II. ①费… III. ①荧光探头-制备 IV. ①O482.31

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2013)第 050456 号

责任编辑:周巧龙 张 星 / 责任校对:邹慧卿

责任印制:钱玉芬 / 封面设计:王 浩

科学出版社出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

北京佳艺恒彩印刷有限公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

\*

2013年3月第一版 开本:B5(720×1000)

2013年3月第一次印刷 印张:23 1/4

字数:454 000

定价:98.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

## 前 言

靶向生物荧光探针是利用荧光探针与靶向分子发生特异性相互作用,释放可被检测的特征性荧光信号,实现粒子定向检测的分析手段。该技术具有灵敏度高、快速准确、专一性强的特点,广泛应用于化学分析、环境分析和生物分析领域,特别适用于对样品的实时监测和生物荧光成像。

作者课题组从 2003 年开始在天津大学姚康德教授的指导下进行荧光探针在癌症早期识别中的相关研究工作,2003 年得到天津市自然科学基金项目“噻唑类探针分子合成及在肿瘤细胞标记研究”的资助。功能染料作为探针分子价格昂贵、合成收率低、分离困难,成为制约探针分子发展的瓶颈问题之一,20 世纪末发展起来的固相合成技术解决了一些液相合成及纯化的技术难题,将该技术引入菁染料探针分子合成有其独特意义。基于此,我们提出“噻唑类菁染料的固相合成及与变异细胞相互作用”的课题,并得到教育部重点基金的支持。课题组采用固相合成技术,对噻唑橙类荧光探针分子合成方法进行研究,得到高纯度高收率的噻唑橙染料分子,反应过程中实现了无痕迹自动切割,提出了制备、纯化探针分子的新途径。

花菁染料荧光吸收光谱范围广,无背景干扰,2006 年课题组提出“高灵敏度壳聚寡糖——花菁荧光探针制备科学及其细胞识别研究”的课题,并得到国家自然科学基金的资助。在噻唑橙类荧光染料固相合成的基础上,我们继续利用固相合成技术合成多甲川花菁染料。树枝状化合物是一种结构完整、高度支化的大分子。功能化位点不同,树枝状化合物表现出的性质也有所不同,如外层功能化时,官能团直接键接到树枝状化合物的表面,负载量大,局部浓度高,有时还表现出官能团之间的协同效应。树枝状化合物官能团之间可实现相互隔离,表现出“高度稀释效应”。在以上研究基础上,课题组在多糖分子上组装不同级次的树枝状化合物并用于修饰菁染料,研究染料-多糖化合物由线状改变为立体结构后对探针分子荧光增强的贡献率。该工作得到国家自然科学基金的支持(项目名称“花菁荧光染料-生物活性多糖与细胞多重相互作用研究”)。

与有机荧光染料相比,量子点具有吸收光谱宽,发射光谱窄,荧光波长可以根据量子点尺寸大小进行调节,荧光量子产率高,荧光寿命长,光稳定性好,不会发生光漂白作用等优点,因此在生物光学中得到广泛应用。荧光共振能量转移(FRET)是一种荧光能量转移的现象,由于 FRET 对于距离和荧光基团的空间取向高度灵敏,可以通过 FRET 效率的测量,观察生物分子间相互作用的改变情况,在生物分子结构和功能研究、免疫分析、核酸杂交分析、蛋白酶活性检测等方面具

有非常重要的应用前景。课题组以量子点为能量供体,有机荧光染料为能量受体,通过探针和癌细胞结合所导致的光学信息变化传感癌细胞信息,加了对癌细胞结构的认识。该工作得到国家自然科学基金的支持(项目名称“量子点-菁染料 FRET 特异性标记荧光探针制备及与癌细胞动态作用过程研究”)。

作为生物荧光探针,如何提高染料的水溶性,在增大其灵敏度的同时提高其光学稳定性是关键问题。壳聚糖是由  $\beta$ -1,4-键合葡糖胺和一部分 N-乙酰基葡糖胺组成的线性阳离子多糖。此种糖胺聚糖型碱性多糖可与细胞膜上的胞壁酸受体残基相互作用。因而可使细胞膜直接即时结合。壳聚糖有很好的组织相容性,且没有细胞毒性。采用壳聚糖修饰的荧光染料容易标记目标细胞,另外,壳聚糖具有很好的化学活性,很容易对其进行化学改性,还可根据特定的对象选择合适的生物分子进行修饰,如修饰配体定位受体及修饰探针 DNA 检测目标 DNA 等,可为生物医学研究提供一种荧光检测新方法。课题组以壳聚糖修饰荧光探针,不仅提高了其水溶性,降低了组织毒性,而且由于一个壳聚糖链上接有多个染料分子,产生荧光加和效应。在壳聚糖修饰荧光探针的基础上,课题组又发展到海藻酸钠等其他生物活性多糖修饰探针,且从线性修饰发展到立体空间结构的枝状化合物,进一步增大负载率,增加荧光加和效应。

靶向性是实用荧光探针所关注的另一个重要问题。鉴于叶酸受体在正常组织中表达高度保守,而在大部分恶性肿瘤(包括乳腺癌、卵巢癌、子宫内膜癌、结肠癌、鼻咽癌、肺癌等)组织中高度表达,利用叶酸受体介导的肿瘤特性显像和治疗受到人们的关注。课题组在研究之初即以叶酸修饰探针,系统开展了增强其靶向性的研究工作。

本书汇集了课题组近十年来的主要相关研究内容和成果,并介绍了国内外相关领域的最新研究进展,体现了该领域研究的完整性、前沿性和交叉性。各章执笔者分别为:第1章,刘丽娟;第2章,朱森、刘丽娟;第3章,费学宁、谷迎春;第4章,费学宁、贾国治;第5章,费学宁、张宝连、朱森;第6,7章,费学宁、刘志军、刘玉茹。最后由费学宁统稿,曹凌云在本书的成稿过程中做了大量的文字整理工作。

此外,课题组历届研究生参与了本书所著内容的研究工作,他们是杨少斌、刘音、兰云泉、孟庆洋、王义启、王军、李超、杨旭等,在此对他们在研究工作中付出的努力表示衷心感谢。也特别感谢书中所引用文献的作者们,同时也特别感谢国家自然科学基金委员会、教育部科技司和天津市自然科学技术委员会对工作的支持和资助。感谢天津市科学技术协会自然科学学术专著资助项目的支持。

由于作者水平有限,书中难免出现不妥和疏漏,恳请读者批评指正。

# 目 录

## 前言

|                                    |    |
|------------------------------------|----|
| <b>第 1 章 生物荧光探针</b> .....          | 1  |
| 1.1 荧光探针的定义及分类 .....               | 1  |
| 1.1.1 有机小分子荧光探针 .....              | 1  |
| 1.1.2 纳米荧光探针 .....                 | 4  |
| 1.1.3 基因荧光探针 .....                 | 5  |
| 1.2 荧光探针的特性 .....                  | 6  |
| 1.2.1 荧光探针的选择原则 .....              | 6  |
| 1.2.2 影响荧光探针性质的因素 .....            | 8  |
| 1.3 荧光探针的结构及设计原理 .....             | 10 |
| 1.3.1 荧光探针结构 .....                 | 10 |
| 1.3.2 荧光探针设计原理 .....               | 10 |
| 1.4 生物荧光探针应用研究进展 .....             | 11 |
| 1.4.1 荧光探针在组织学中的应用 .....           | 12 |
| 1.4.2 荧光探针在微生物学中的应用 .....          | 13 |
| 1.4.3 荧光探针在药学方面的应用 .....           | 15 |
| 1.4.4 荧光探针在活细胞标记中的应用 .....         | 16 |
| 1.4.5 荧光探针在活体成像中的应用 .....          | 17 |
| 1.4.6 荧光探针在肿瘤标记中的应用 .....          | 18 |
| 参考文献 .....                         | 20 |
| <b>第 2 章 肿瘤常用检测方法及荧光标记技术</b> ..... | 23 |
| 2.1 肿瘤的特征 .....                    | 23 |
| 2.1.1 肿瘤的形态学特征 .....               | 24 |
| 2.1.2 肿瘤标志物 .....                  | 28 |
| 2.2 肿瘤的常用检测方法 .....                | 38 |
| 2.2.1 肿瘤的临床诊断 .....                | 38 |
| 2.2.2 肿瘤影像学诊断 .....                | 39 |
| 2.2.3 肿瘤的内镜诊断 .....                | 41 |
| 2.3 生物荧光标记技术 .....                 | 45 |
| 2.3.1 有机荧光染料探针 .....               | 46 |

|                                       |                                                 |     |
|---------------------------------------|-------------------------------------------------|-----|
| 2.3.2                                 | 无机荧光量子点 .....                                   | 63  |
| 2.3.3                                 | 掺杂染料的复合荧光纳米颗粒 .....                             | 69  |
| 2.3.4                                 | 用于肿瘤成像的磁性纳米微粒 .....                             | 73  |
| 2.3.5                                 | 多功能性荧光纳米粒子 .....                                | 74  |
| 2.3.6                                 | 荧光蛋白 .....                                      | 75  |
| 参考文献 .....                            |                                                 | 82  |
| <b>第3章 菁染料荧光探针分子的设计、合成</b> .....      |                                                 | 89  |
| 3.1                                   | 菁染料探针的合成及应用进展 .....                             | 89  |
| 3.1.1                                 | TO系列荧光染料探针分子的合成及应用 .....                        | 90  |
| 3.1.2                                 | YO系列荧光染料探针分子的合成及应用 .....                        | 93  |
| 3.1.3                                 | 吡啶 Cy <sub>n</sub> 类菁染料 .....                   | 96  |
| 3.1.4                                 | 其他甲川类菁染料的研究进展 .....                             | 106 |
| 3.2                                   | 嵌入式菁染料的合成及光谱性能 .....                            | 114 |
| 3.2.1                                 | 嵌入式菁染料 TO 的液相合成 .....                           | 114 |
| 3.2.2                                 | 嵌入式菁染料 TO 的固相合成 .....                           | 125 |
| 3.2.3                                 | TO-COOH(5c) 单晶 .....                            | 132 |
| 3.2.4                                 | TO、YO 及其衍生物的光谱特性 .....                          | 135 |
| 3.3                                   | 吡啶类荧光菁染料的合成及光谱特性 .....                          | 138 |
| 3.3.1                                 | 吡啶 Cy <sub>3</sub> 类菁染料的合成及光谱研究 .....           | 138 |
| 3.3.2                                 | 吡啶-噻啉三甲川类菁染料 .....                              | 142 |
| 3.4                                   | 吡啶桥基苯乙烯菁染料的设计合成 .....                           | 148 |
| 3.4.1                                 | 吡啶桥基苯并噻啉-噻啉(吡啶)苯乙烯菁染料的合成及光谱研究 .....             | 155 |
| 3.4.2                                 | 吡啶桥基苯并噻啉-吡啶苯乙烯菁染料的合成及光谱研究 .....                 | 172 |
| 3.5                                   | 吡啶[3,2-b]吡啶苯乙烯菁染料的合成及光谱研究 .....                 | 181 |
| 3.5.1                                 | 吡啶吡啶化合物的特性及应用 .....                             | 181 |
| 3.5.2                                 | 荧光探针 2QICZ, 6QICZ 和 6IICZ, 2IICZ 的合成及光谱研究 ..... | 184 |
| 3.6                                   | 荧光探针分子 TICQ 和 TICI 的合成、表征及光谱特性 .....            | 196 |
| 3.6.1                                 | 中间体的合成及表征 .....                                 | 196 |
| 3.6.2                                 | 荧光染料 TICQ 和 TICI 的合成及表征 .....                   | 197 |
| 3.6.3                                 | 中间体结构表征 .....                                   | 199 |
| 3.6.4                                 | 染料 TICI 的光谱性质 .....                             | 199 |
| 3.6.5                                 | 染料 TICQ 的光谱性质 .....                             | 202 |
| 参考文献 .....                            |                                                 | 207 |
| <b>第4章 功能性荧光量子点设计、制备及微观输运机制</b> ..... |                                                 | 215 |
| 4.1                                   | 核壳结构量子点理论分析 .....                               | 216 |

|       |                                                                |     |
|-------|----------------------------------------------------------------|-----|
| 4.1.1 | 核壳结构量子点基本理论 .....                                              | 216 |
| 4.1.2 | CdS/ZnS 核壳结构量子点电子结构和光学性质 .....                                 | 218 |
| 4.1.3 | CdSe/ZnS 核壳结构量子点电子结构和光学性质 .....                                | 221 |
| 4.1.4 | CdS/CdZnS 核壳结构量子点电子结构和光学性质 .....                               | 223 |
| 4.1.5 | $\text{ZnTe}_{1-x}\text{Se}_x/\text{ZnSe}$ 核壳结构量子点类型调控 .....   | 227 |
| 4.2   | 功能性量子点的水相制备 .....                                              | 233 |
| 4.2.1 | ZnSe 量子点的制备 .....                                              | 233 |
| 4.2.2 | II 型半导体异质结核壳结构量子点的制备 .....                                     | 237 |
| 4.2.3 | CdTe/CdS 包核量子点 .....                                           | 241 |
| 4.2.4 | Cu 掺杂的 CdSe 量子点 .....                                          | 246 |
| 4.2.5 | 量子点-菁染料复合染料探针 .....                                            | 252 |
| 4.2.6 | 复合探针微观输运变化过程研究 .....                                           | 259 |
|       | 参考文献 .....                                                     | 260 |
| 第 5 章 | 有机荧光染料探针分子的改性及光谱性能 .....                                       | 264 |
| 5.1   | 壳聚糖对荧光染料的改性 .....                                              | 264 |
| 5.1.1 | 壳聚糖的性质及应用 .....                                                | 264 |
| 5.1.2 | 壳聚糖对菁染料的改性 .....                                               | 267 |
| 5.1.3 | 壳聚糖修饰咪唑桥苯乙烯类荧光染料的合成与表征 .....                                   | 274 |
| 5.1.4 | 壳聚糖修饰 CdTe/CdS 纳米量子点的合成与表征 .....                               | 276 |
| 5.1.5 | 壳聚糖改性荧光探针的光谱特性 .....                                           | 277 |
| 5.2   | 树枝状聚合物支载的荧光染料复合探针 .....                                        | 279 |
| 5.2.1 | 树枝状聚合物 .....                                                   | 280 |
| 5.2.2 | 树枝状聚合物对嵌入式菁染料的修饰 .....                                         | 290 |
| 5.2.3 | 树枝状聚合物-杯芳烃支载荧光染料复合体系 .....                                     | 300 |
| 5.3   | 叶酸对荧光染料的改性 .....                                               | 304 |
| 5.3.1 | 叶酸改性 $\text{TO-NH}_2$ ( $\text{TO-NH}_2$ -folate) 的制备及光谱 ..... | 305 |
| 5.3.2 | $\text{TO-COOH-CTS-folate}$ 的制备及表征 .....                       | 308 |
| 5.3.3 | $\text{Cy}_3\text{-CTS-folate}$ 的制备、表征及光谱特性 .....              | 310 |
|       | 参考文献 .....                                                     | 313 |
| 第 6 章 | 荧光探针生物标记 .....                                                 | 317 |
| 6.1   | 荧光探针与牛血清白蛋白的作用特性 .....                                         | 317 |
| 6.1.1 | 荧光染料与牛血清白蛋白的作用研究 .....                                         | 317 |
| 6.1.2 | 荧光探针对于 BSA 的标记特性 .....                                         | 319 |
| 6.1.3 | 量子点与牛血清白蛋白的作用关系 .....                                          | 330 |
| 6.2   | 荧光探针与 DNA 作用 .....                                             | 333 |

---

|                                   |            |
|-----------------------------------|------------|
| 6.3 荧光探针的肿瘤标记成像 .....             | 335        |
| 6.3.1 荧光探针标记肿瘤细胞研究 .....          | 337        |
| 6.3.2 荧光探针的活体靶向标记 .....           | 342        |
| 参考文献 .....                        | 347        |
| <b>第7章 荧光探针检测系统与实例 .....</b>      | <b>349</b> |
| 7.1 激光扫描共聚焦显微镜 .....              | 349        |
| 7.1.1 激光扫描共聚焦显微镜的基本原理 .....       | 349        |
| 7.1.2 激光扫描共聚焦显微镜在肿瘤检测中的应用 .....   | 351        |
| 7.2 流式细胞仪 .....                   | 353        |
| 7.2.1 流式细胞仪的原理 .....              | 353        |
| 7.2.2 流式细胞仪的荧光测量及数据显示 .....       | 354        |
| 7.2.3 流式细胞仪在肿瘤检测中的应用 .....        | 356        |
| 7.3 活体动物荧光成像技术 .....              | 357        |
| 7.3.1 活体动物荧光成像系统的原理 .....         | 357        |
| 7.3.2 活体动物荧光成像一般步骤 .....          | 358        |
| 7.3.3 活体动物荧光成像系统在荧光探针研究中的应用 ..... | 358        |
| 7.4 荧光相关光谱 .....                  | 360        |
| 7.4.1 仪器结构及原理 .....               | 360        |
| 7.4.2 荧光相关光谱应用 .....              | 360        |
| 参考文献 .....                        | 362        |

# 第 1 章 生物荧光探针

## 1.1 荧光探针的定义及分类

当紫外光照射到某些物质时,这些物质会发射出不同颜色和不同强度的可见光,当紫外光停止照射时,这种光线也随之消失,这种光线称为荧光。利用某些物质被紫外光照射后所产生的能够反映出该物质特性的荧光,进行该物质的定性分析和定量分析的方法,称为荧光分析。

荧光分析方法由于灵敏度高、选择性好、所需试样量小,在分析化学,尤其是生物分析中被广泛应用。由于大多数生物分子本身荧光较弱或基本无荧光,检测灵敏度较差,使得荧光探针检测技术的应用成为客观可能。荧光探针技术指人们用强荧光的标记试剂或光生成试剂对待测物进行标记或衍生,生成具有高荧光强度的以共价或非共价结合的物质,从而实现对待测物质的定性定量分析。随着生物技术的不断发展,荧光探针技术已经在核酸、蛋白质、细胞检测免疫分析等领域得到了重要应用,并表现出快速、灵敏、高通量和易实现自动化等特点。尤其是近年来发展起来的荧光化学传感器和分子信号系统,其应用已深入到药理学、生理学、环境科学、信息科学、生命科学等多个领域。

荧光探针是指在紫外-可见-近红外区有特征荧光,并且其荧光性质(激发和发射波长、强度、寿命、偏振等)可随所处环境的性质,如极性、折射率、黏度等改变而灵敏改变的一类荧光物质。按照制备方法可将荧光探针分为化学荧光探针和基因荧光探针两种。其中,化学荧光探针是指通过化学方法合成的一类荧光探针,包括有机小分子探针和纳米荧光探针;而基因荧光探针是指可遗传、可由 DNA 编码及蛋白质组成的一类荧光探针,如荧光蛋白(GFP、YFP、DsRed 等)。

### 1.1.1 有机小分子荧光探针

按用途分,主要有细胞活性探针、膜荧光探针、细胞器探针、细胞骨架探针、核酸探针、胞内离子探针、pH 探针、电位敏感探针、活性氧探针、笼锁化合物探针。

按照化学结构分,有苯系衍生物、萘系衍生物、吡啶衍生物、喹啉衍生物、香豆素衍生物、茈萸衍生物和苯并五元杂环类衍生物等。

#### 1) 苯的衍生物

具有共轭不饱和长链的苯系衍生物,如 1,6-二苯基-1,3,5-己三烯(diphenyl-

hexatriene, DPH, 图 1-1) 及其衍生物 TMA-DPH [ $N, N, N$ -trimethyl-4-(6-phenyl-1,3,5-hexatrien-1-yl) phenylammonium  $p$ -toluenesulfonate, 图 1-2], 是一类很好的疏水性膜探针, 当它们从极性介质中转入膜或卵磷脂中时便可发出很强的荧光。

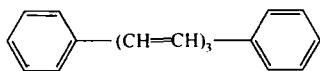


图 1-1 DPH 结构式

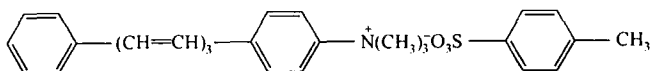


图 1-2 TMA-DPH 结构式

## 2) 吡啶衍生物

吡啶衍生物(pyridine derivative)作为探针主要为  $N$ -取代(图 1-3)或 4-取代苯乙烯基吡啶(图 1-4)结构, 它们在水中几乎没有荧光, 但与脂或膜材料结合后荧光量子产率增加, 因为该分子中存在正电荷, 因此还可用于表面电荷的测定。

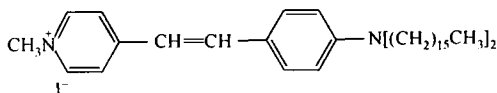


图 1-3 神经元示踪器 DIA

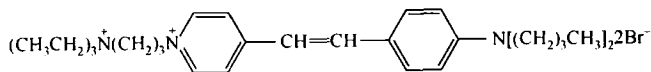


图 1-4 细胞膜标记物:  $N$ -(3-三乙基铵丙基)-4-[4-(二丁基氨基)苯乙烯基]吡啶二溴盐

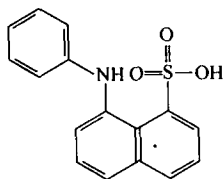


图 1-5 1,8-ANS( $N$ -苯基-1-萘胺-8-磺酸)结构式

## 3) 萘的衍生物

萘磺酸(naphthalene sulfonic acid)的氨基取代衍生物, 如 1,8-ANS 及其盐类(图 1-5), 对环境极性变化异常敏感, 在极性溶剂中几乎无荧光, 但在非极性溶剂中可产生强荧光, 可作为膜和蛋白质的检测探针。含硝基萘的衍生物是缺氧细胞膜的功能探针, 它们本身无荧光, 但当硝基被还原成氨基时, 该分子可

发出强荧光。

## 4) 苯并五元杂环类衍生物

苯并五元杂环类衍生物, 如苯并咪唑及吡啶等都是常用于穿透细胞膜的荧光探针, 并用于 DNA 染色。常用作荧光探针的苯并五元杂环类衍生物的结构式如图 1-6 所示。

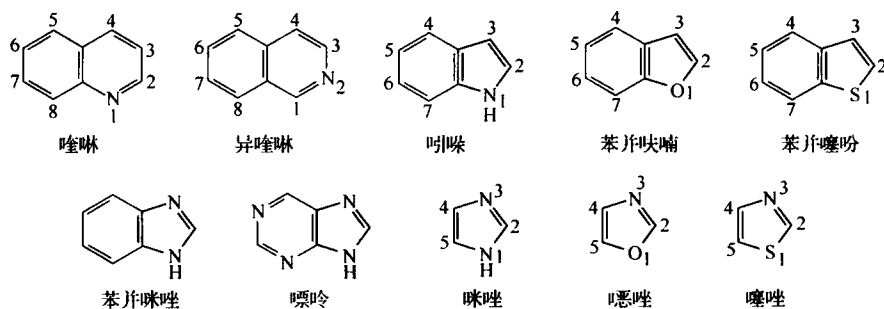
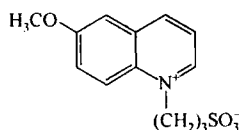
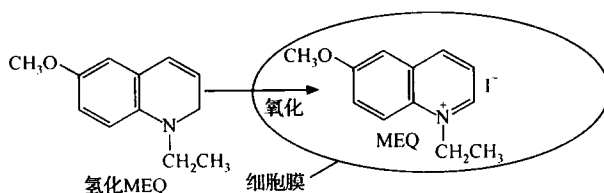


图 1-6 常用作荧光探针的苯并五元杂环类衍生物

其中, *N*-取代喹啉衍生物或 6-甲氧基喹啉都具有良好的水溶性和膜渗透性, 如 6-甲氧基-*N*-(3-磺酸丙基)喹啉鎓 (SPQ) (图 1-7), 可成为膜微囊和细胞检测的理想探针。以 6-甲氧基-*N*-乙基喹啉鎓碘化物 (MEQ) 为例, 氢化 MEQ 是一种膜透过物, 可进入细胞并在细胞内发生氧化反应生成荧光指示剂 MEQ, 从而实现了对细胞的检测, 传递过程示意图如图 1-8 所示。

图 1-7 6-甲氧基-*N*-(3-磺酸丙基)喹啉鎓 (SPQ)图 1-8 6-甲氧基-*N*-乙基喹啉鎓碘化物 (MEQ) 实现细胞内传递过程示意图

### 5) 香豆素衍生物

香豆素 (coumarin) 本身就是一个很好的荧光试剂。其 7-羟基衍生物, 如 7-羟基-4-甲基香豆素 (图 1-9), 有比香豆素更强的荧光。7-羟基香豆素及其衍生物可作为生理 pH 测定的探针, 其酯则可作水解酶的底物。

### 6) 芘类衍生物

芘 (pyrene) 本身可直接用作膜的结构探针。芘的 1,3,6,8 位磺酸基和羟基取代衍生物 (图 1-10) 对环境很敏感, 可作为蛋白质、核酸和抗体探针。

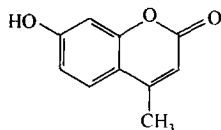


图 1-9 7-羟基-4-甲基香豆素

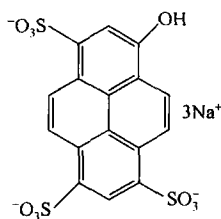


图 1-10 8-羟基-1,3,6-三磺酸钠盐

### 7) 其他结构类型

除了以上常用的荧光探针之外,还有一些多环芳烃衍生物,如荧光素、罗丹明、氟化硼络合二吡咯等也常用作荧光探针(其结构式详见第2章)。

### 1.1.2 纳米荧光探针

作为一种新型的荧光探针,纳米荧光探针所特有的量子尺寸效应和小尺寸效应使之呈现出许多与同质单个分子或大块物体不同的光学性质,因此,纳米材料作为荧光探针用于分析化学的研究引起了人们的广泛关注。

目前研究最多的是半导体纳米微粒,它是由数目极少的原子或分子组成的纳米尺度范围内的具有半导体性质的微粒,也称为量子点。量子点标记作为一种新的标记方法,具有荧光发光光谱较窄、量子产率高、不易漂白、激发光谱宽、颜色可调、光化学稳定性高及不易分解等诸多优点,在生物化学、分子生物学、细胞生物学、基因组学、蛋白质组学、药物筛选、生物大分子相互作用等研究中有较好的应用前景。尽管在许多性质上量子点要优于传统有机染料,但在实际应用中还存在着一些必须解决的问题。目前很多研究主要集中在如何解决量子点的生物安全性等问题上。通过一些生物安全性好的材料对其进行包裹,如脂质体、高分子纳米颗粒及二氧化硅等,可制成复合型纳米荧光探针<sup>[1]</sup>。

#### 1) 脂质体

脂质体是由球形的磷脂分子簇形成的双层脂膜,可以采用不同脂类制备。根据不同的制备构成和脂质组成,它们的直径从 50 nm 到 1000 nm 不等。脂质体大致可划分为小单层脂质体(20~200 nm)和大单层脂质体(200~1000 nm)。由于独特的双层结构,脂质体已成功地用作载体运送选取的药物到巨噬细胞。脂质体能够有效地被巨噬细胞吞噬,研究表明,无论在体外还是体内,脂质体都能运送药物到达巨噬细胞,但是脂质体的稳定性需要进一步研究和改善。

#### 2) 高分子荧光纳米颗粒

纳米高分子复合材料是近年来高分子材料科学发展迅速的新领域。纳米复合材料是将两种或两种以上的材料复合在一起,进行优势互补,以谋求最佳的综合性

能。高分子荧光纳米微球,是以聚丙烯酰胺类、聚甲基丙烯酸酯类、聚苯乙烯为微粒主体,表面键合或吸附,如菁染料、罗丹明(rhodamine)、荧光素(fluorescein,如 FITC 等)等荧光物质的荧光纳米微球。

单个纳米粒子可以键合多个荧光染料分子,从而导致荧光强度增强。但荧光染料分子并没有被高分子材料包覆和保护,仍然受外界氧化或光漂白的影响,同时荧光的稳定性也没有提高。后来通过染料分子与聚合物链的共价作用,将染料分子进行掺杂,或将染料分子物理吸附进入交联的粒子中。这些方法经常导致低的掺杂效率,且对染料的保护不够,因此使得染料探针在工作环境中从粒子中泄漏、猝灭和光漂白。此外高分子荧光纳米颗粒作为荧光探针使用还存在以下问题,如一般高分子介质材料的密度较小,在制备过程中进行分离洗涤、离心沉淀比较困难,导致所制备的微粒尺寸较大;另外,高分子纳米颗粒在水溶液中容易发生凝聚现象。

### 3) 核壳型荧光二氧化硅纳米颗粒

核壳型荧光二氧化硅纳米粒子是由荧光的内核、可生物修饰的硅壳以及修饰在硅壳表面的生物分子构成,具有明显核壳结构的一类新型纳米颗粒。作为外壳的纳米二氧化硅具有很好的生物相容性,易于表面改性和标记,且具有好的机械和化学稳定性,尺寸易于控制并具有优异的光学透光性和低荧光背景等。其内核材料可以是荧光染料、量子点以及荧光蛋白等,这些内核材料可以包裹或连接到二氧化硅形成的外壳中,如包含着稀土配合物的纳米粒子、包裹着若干染料分子的荧光纳米颗粒等。用多个发光分子组成的纳米颗粒是一种集成的先进方法。

## 1.1.3 基因荧光探针

基因荧光探针是指荧光蛋白和藻红蛋白。荧光蛋白多适用于标记肿瘤细胞、病毒、基因等,通常使用的是绿色荧光蛋白(GFP)、增强绿色荧光蛋白(EGFP)、红色荧光蛋白(DsRed)等。作为标记物,基因荧光探针可以反映基因表达水平或与融合蛋白的亚细胞定位;作为指示剂,基因探针的荧光变化可以反映出相关环境因子和蛋白质间相互作用的改变;作为报告基因,GFP 发光不需要底物的特性,使其在研究胚胎及动物个体转基因和监测基因转移效率时有极大的优势。利用直接注射 GFP 标记裸鼠中的肿瘤细胞后进行荧光检测,不仅标记了肿瘤性状,同时也能检测到癌细胞的转移;作为融合标记,大部分 GFP 的成功应用以及与其他基因的融合,可监测蛋白质的分布和命运。主要方法是将目的蛋白基因与 GFP 基因融合,然后在特定的细胞或组织中表达。这主要是因为融合蛋白能保持原有的功能,而 GFP 能使其发光。GFP 已被用于大部分细胞器的定位,包括血细胞薄膜、神经核、内质网、高尔基器、分泌小泡、线粒体、过氧化物酶体、液泡和吞噬小体等的定位分析。

## 1.2 荧光探针的特性

理想的生物荧光探针应该具有以下特点<sup>[2]</sup>:第一,荧光探针的荧光必须与生物样品的背景荧光易于区别;第二,荧光探针必须不干扰研究的主体;第三,荧光探针主要用于生物活体或在天然生物条件下的体外样品的研究,因此荧光探针的毒性、使用的 pH 范围及生物相容性等方面必须符合生物体的正常机能要求。

然而,在标记过程中,生物荧光探针的荧光性质会受到生物主体诸多因素的干扰;另外,荧光探针的引入不可避免地会对检测体系的原有状态产生或多或少的影响。例如,抗体上标记荧光染料后,如果每个抗体上结合的荧光基团超过 4 个,一般会降低抗体的亲和力。

### 1.2.1 荧光探针的选择原则

#### 1) 荧光的定性或定量

定性研究一般选择单波长激发探针,而定量研究最好选择双波长激发的比率探针,以利于制作标准曲线。

#### 2) 荧光探针的特异性和毒性

根据实验目的,尽可能地选择毒性小、特异性高的探针。不是所有荧光探针都具有特异性,要实现荧光探针的特异性一般需要两部分:荧光团和对目标靶点具有特别专一性识别作用的特定配体或是化学官能团。受体配体的相互作用一般包括抗原-抗体、生物素-抗生物素、酶-底物、叶酸-叶酸受体等。

#### 3) 荧光探针适用的 pH

一般情况下,荧光探针要适合于生理条件下的 pH 环境要求。当探针用于非生理条件时,应根据 pH 要求作出相应选择,同时,配制溶液时也应该注意这个问题。

#### 4) 激发波长与发射波长

电子跃迁时吸收或发射的能量受到电子能级的制约,只能吸收或发射一定波长范围内的光。荧光探针大多是含有共轭双键体系的有机化合物,共轭双键使其容易吸收激发光,其激发波长大多处于近紫外区或可见光区,发射波长多处于可见光区。激发波长和发射波长决定了使用光源的选择。例如,如果染料的激发波长处于紫外区,则必须使用紫外光源。常用的光源有汞灯(其主要峰值在 366 nm、405 nm、436 nm、546 nm 和 575 nm),氙灯(连续光),氩离子激光器(458 nm、488 nm 和 514 nm),氩-氦激光器(488 nm、568 nm 和 647 nm)和氦-氖激光器(543 nm、594 nm 和 633 nm)。

染料的发射波长总是大于其激发波长,两者的差值称为斯托克斯(Stokes)位

移。不同结构的有机染料,相应的 Stokes 位移差别较大。染料的 Stokes 位移越大,其激发光谱和发射光谱的重叠就越少,有利于提高其分辨率。

#### 5) 荧光强度

荧光强度决定了染料检测的灵敏度。其本身取决于染料的摩尔吸光系数和荧光的量子产率,在确定的条件下,两者为定值。摩尔吸光系数反映了染料吸收激发光的能力,而量子产率反映了染料将吸收的辐射能转化为荧光的效率。当荧光探针与细胞结合或生物分子结合时,其量子产率应接近或大于 0.4,否则没有实用价值。

#### 6) 荧光寿命

荧光寿命即激发态寿命,是指分子在激发态的平均停留时间。若分子受激后迅速弛豫,则可实现多次激发,因此荧光寿命短时可提高灵敏度。大多数荧光探针的荧光寿命在纳秒级,如荧光素为 4ns。特别长的荧光寿命对于高灵敏度检测也很有意义。例如,利用稀土离子配合物的长寿命荧光而建立的时间分辨荧光测量技术,可极大地提高检测的灵敏度。所谓时间分辨荧光测量技术,就是采用时间延迟技术在激发后延迟一段时间,等短寿命的散射光和自身本底荧光等干扰信号衰减后,再测量荧光探针特异的荧光信号,这样可大大排除干扰信号,同时提高检测的特异性和灵敏度。

#### 7) 光稳定性

提高激发光的强度固然可以提高信号的强度,但是激发光的强度超过一定限度时,光吸收就趋于饱和,并不可逆地破坏激发态分子,这就是光漂白现象。对于流式细胞仪,光漂白的问题并不严重,因为光源照射细胞的时间很短;但对于荧光显微镜等,光源需长时间照射样品,否则光漂白现象会严重影响测量。解决光漂白问题最直接的方法就是提高测量的灵敏度,以降低光照的强度。

在荧光定量和动态荧光监测时,要选择光稳定性较高的荧光探针,同时在实验时通过减少扫描次数或降低激光强度来减少光漂白的程度;但是,在利用荧光漂白后恢复(FRAP)等原理检测膜的流动性或细胞间的通信时,所选的荧光探针则需两者同时兼备。

#### 8) 荧光量子产率

荧光量子产率可用物质所发射出的荧光量子数和所吸收激发光的量子数的比值表示,此值往往小于 1,如罗丹明 B 在乙醇中的荧光量子产率为 0.97,荧光黄在水中的荧光量子产率为 0.65。而许多吸光物质的荧光量子产率很低,不能产生荧光。因为这些物质吸收了激发光的能量后,再把这部分能量释放出来时,其中大部分用于同类分子或与其他分子碰撞时的消耗,以热能的形式释放,所以无荧光发射。

### 1.2.2 影响荧光探针性质的因素

荧光探针的荧光强度与其结构有密切的关系,强荧光物质往往具备如下特征<sup>[3]</sup>:

(1) 具有大的共轭  $\pi$  键结构:发生荧光(或磷光)的物质,其分子都含有共轭双键( $\pi$  键)体系。共轭体系越大,离域  $\pi$  电子越容易激发,荧光越容易产生。大部分荧光物质都具有芳环或杂环,芳环越大,其荧光峰越移向长波长方向,且荧光强度也较强。同一共轭环数的芳族化合物,线性环结构者的荧光波长比非线性者要长。共轭效应使荧光增强的原因,主要是由于共轭效应增大了荧光物质的摩尔吸光系数,有利于产生更多的激发态分子,从而有利于荧光的发生。

(2) 具有刚性的平面结构:实验发现,多数具有刚性平面结构的有机分子具有强烈的荧光,且荧光量子产率高。因为这种结构可以减少分子的振动,使分子与溶剂或其他溶质分子的相互作用减少,同时也就减少了碰撞失活的可能性。

(3) 取代基团为给电子取代基:取代基的性质(尤其是发色基团)对荧光体的荧光特性和荧光强度均有强烈的影响。给电子基团,如 $-\text{OH}$ 、 $-\text{OR}$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{NR}_2$ 等的引入可使探针分子的荧光增强。因为产生了  $p-\pi$  共轭作用,增强了  $\pi$  电子共轭程度,从而使最低激发单重态与基态之间的跃迁概率增大。吸电子基团,如 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{NO}$ 、 $-\text{C}=\text{O}$ 、卤素等,会减弱荧光强度甚至出现猝灭荧光。卤素取代基随原子序数的增加而使探针的荧光降低。这可能是由重原子效应使系间跨越速率增加所致。在重原子中,能级之间的交叉现象比较严重,容易发生自旋轨道的相互作用,因此增加了由单重态转化为三重态的速率。另外,取代基的空间障碍和分子的立体异构现象对荧光强度也有影响。

此外,有机染料的荧光光谱和量子产率是受环境影响的,这也是很多染料具有探针作用的基础。影响荧光探针荧光性质的环境因素主要有<sup>[4]</sup>以下几种。

(1) 溶液的 pH:荧光探针是否发射荧光,辐射何种荧光与其在溶液中的存在状态有关,如 1-萘-6-磺酸呈一价离子时无荧光,呈负二价离子时才能发射蓝色荧光。荧光探针中含有酸性或碱性助色团,溶液的酸碱性对其电离产生影响,如 1-萘酚-6-磺酸在 pH 6.4~7.4 的溶液中会发生蓝色荧光,当 pH 低于 6.4 时则不发生荧光。不电离的荧光探针在各种 pH 溶液中都可发生荧光。pH 不仅影响有机试剂的电离,而且对金属络合物的组成也会产生影响。因此,pH 可对金属络合物的荧光性质产生较大影响。

(2) 温度:荧光探针的荧光量子产率和荧光强度通常随溶液温度的降低而增加,如荧光黄的乙醇溶液在  $0^\circ\text{C}$  以下,每降低  $10^\circ\text{C}$ ,荧光量子产率增加 3%,冷至  $-80^\circ\text{C}$  时,荧光量子产率接近 100%,反之则减弱。温度升高,分子热运动加剧,分子碰撞概率增加,使处于激发态的  $\pi$  电子难以维持稳定的时间,导致荧光的猝灭。