



同濟大學

TONGJI UNIVERSITY

**博士学位论文**

**基于无机-有机功能纳米材料检测金属离子  
及其生物成像**

(国家自然科学基金项目 编号: 21175098)

姓 名: 朱安伟

学 号: 1010104005

所在院系: 化学系

学科门类: 理学

学科专业: 分析化学

指导教师: 田阳 教授

二〇一三年七月



同濟大學  
TONGJI UNIVERSITY

A dissertation submitted to  
Tongji University in conformity with the requirements for  
the degree of Doctor of Philosophy

## **Inorganic-Organic Functional Nanomaterials for Biosensing and Bioimaging of Metal Ions**

Candidate: Anwei Zhu

Student Number: 1010104005

School/Department: Department of Chemistry

Discipline: Science

Major: Analytical Chemistry

Supervisor: Prof. Yang Tian

July, 2013

基于无机—有机功能纳米材料检测金属离子及其生物成像

朱安伟

同济大学

## 学位论文版权使用授权书

本人完全了解同济大学关于收集、保存、使用学位论文的规定，同意如下各项内容：按照学校要求提交学位论文的印刷本和电子版；学校有权保存学位论文的印刷本和电子版，并采用影印、缩印、扫描、数字化或其它手段保存论文；学校有权提供目录检索以及提供本学位论文全文或者部分的阅览服务；学校有权按有关规定向国家有关部门或者机构送交论文的复印件和电子版；在不以赢利为目的的前提下，学校可以适当复制论文的部分或全部内容用于学术活动。

学位论文作者签名：

年      月      日

## 同济大学学位论文原创性声明

本人郑重声明：所呈交的学位论文，是本人在导师指导下，进行研究工作所取得的成果。除文中已经注明引用的内容外，本学位论文的研究成果不包含任何他人创作的、已公开发表或者没有公开发表的作品的内容。对本论文所涉及的研究工作做出贡献的其他个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本学位论文原创性声明的法律责任由本人承担。

学位论文作者签名：

年 月 日

## 摘要

铜是人体内第三丰度的微量金属元素，其氧化还原性对于有机体维持正常的生理功能具有重要的作用。当细胞内铜的动态平衡发生紊乱时会引起氧化应激，并进一步破坏核酸、蛋白质等生物大分子。因此，细胞通过复杂的铜摄取、转运与储存机制，严格控制着细胞内铜的水平与分布。目前，关于高等真核细胞尤其是与脑、心脏、肠、肝等组织相关的特定细胞是如何在亚细胞层次调节铜离子的水平与分布，并且细胞内铜的动态平衡发生紊乱与衰老和疾病的关系的问题还没有理解清楚。因此，发展能够检测活细胞内铜离子的荧光分析法，对于理解铜离子在各种生理病理过程中的复杂作用具有重要的意义。

本文将特异性识别单元（如有机小分子、生物分子）与具有优异光电特性的无机纳米材料（如半导体量子点、碳纳米点、石墨烯量子点）复合发展了三种  $\text{Cu}^{2+}$  比率型荧光探针。通过在羧基化的  $\text{CdSe/ZnS}$  量子点表面修饰有机荧光分子 *N*-pyridin-4-ylmethylethane-1,2-diamine (PYEA) 和金属离子配体 *N*-(2-aminoethyl)-*N,N',N'*-tris(pyridin-2-ylmethyl)ethane-1,2-diamine (AE-TPEA)，既改进了  $\text{CdSe/ZnS}$  量子点对  $\text{Cu}^{2+}$  的选择性，也实现了双发射荧光，并且借助比率荧光成像法检测到细胞内  $\text{Cu}^{2+}$  的浓度变化。考虑到半导体量子点与环境与生物体的潜在危害，而碳纳米点 (C-dots) 由于具有出色的生物相容性和表面易于功能化的优点，本文将表面覆盖  $\text{SiO}_2$  壳层的  $\text{CdSe/ZnS}$  量子点与 C-dots 组装成纳米复合材料 ( $\text{CdSe@C}$ )，然后再与有机功能配体 AE-TPEA 耦合，制备了  $\text{Cu}^{2+}$  比率型荧光探针 ( $\text{CdSe@C-TPEA}$ )。由于被包裹在纳米硅球核心， $\text{CdSe/ZnS}$  量子点既不受金属离子干扰，也能避免本身对细胞的毒性。基于该比率型探针良好的选择性、荧光稳定性和生物相容性，实现了基于碳纳米点复合材料的细胞内铜离子传感与荧光成像。为了更好地理解  $\text{Cu}^{2+}$  的动态平衡在某些生理病理过程中的作用，我们通过在石墨烯量子点 (GQDs) 表面修饰耐尔蓝染料 (Nile blue A) 和去铜超氧化物歧化酶 ( $\text{E}_2\text{Zn}_2\text{SOD}$ )，设计并合成了在双光子激发下具有双发射荧光的无机-有机功能纳米探针  $\text{GQD@Nile-E}_2\text{Zn}_2\text{SOD}$ 。由于  $\text{E}_2\text{Zn}_2\text{SOD}$  能够选择性地与  $\text{Cu}^{2+}$  重组后淬灭 GQDs 的蓝色荧光，而 Nile blue A 不受干扰，所以该纳米探针可以比率型荧光检测  $\text{Cu}^{2+}$ 。同时，基于该纳米复合材料优异的生物相容性和荧光稳定性，在实现双光子比率型荧光成像活细胞和组织切片不同深度的  $\text{Cu}^{2+}$  后，我们进一步研究了抗坏血酸处理细胞对去铜超氧化物歧化酶重组过程的影响。

**关键词：**铜离子，碳纳米点，半导体量子点，比率型荧光探针，荧光成像

## Abstract

Copper (Cu) is an essential trace element which ranks the third in abundance in the human body. The ability of Cu to cycle between oxidized  $\text{Cu}^{2+}$  and reduced  $\text{Cu}^+$  states is used by cuproenzymes involved in redox reactions, and plays a pivotal role in many physiological processes in organisms. However, alterations in the cellular copper homeostasis may cause oxidative stress, and destroy nucleic acids and proteins. So, the cells exert precise control over their cellular copper pools by an array of uptake, trafficking, and storage mechanisms that effectively maintain a low concentration of free copper ions. In higher eukaryotes, and particularly in specialized cell types associated with brain, heart, intestine, and liver tissue, the molecular specifics of how copper pools are regulated at the subcellular level and the consequences of copper misregulation in aging and diseases remain insufficiently understood. The development of fluorescent probes that can sense and image the intracellular copper pool will contribute to understanding the complex roles of copper in physiological and pathological processes.

By the integration of highly specific recognition elements, such as organic molecules or biomolecules, into inorganic nanomaterials of unique electronic and optical characteristics, such as semiconductor quantum dots, carbon nanodots or graphene quantum dots, this dissertation describes the synthesis and characterization of three new ratiometric fluorescent sensors for  $\text{Cu}^{2+}$ . First, by co-modifying CdSe/ZnS quantum dots with *N*-pyridin-4-ylmethylene-ethane-1,2-diamine (PYEA) and [N-(2-aminoethyl)-N,N',N'-tris(pyridin-2-ylmethyl)ethane-1,2-diamine] (AE-TPEA), the selectivity of CdSe/ZnS quantum dots and dual emission of nanocomposites can be achieved, and thus the ratiometric fluorescent biosensing and bioimaging of intracellular  $\text{Cu}^{2+}$  was fulfilled. Owing to the potential hazards of semiconductor quantum dots to living cells and the nontoxicity of carbon nanodots (C-dots) with tunable surface functionalities, we integrated an organic molecule specific for  $\text{Cu}^{2+}$  ions, AE-TPEA, into the hybrid system composed of C-dots and CdSe/ZnS quantum dots and thus developed a selective and sensitive ratiometric probe for intracellular sensing and imaging of  $\text{Cu}^{2+}$  ions. As CdSe/ZnS quantum dots were embedded in silica shells, the quantum dots were nontoxic to living cells and insensitive to outer interferences. In view of good selectivity, fluorescence stability

and biocompatibility, the inorganic-organic fluorescent probe was successfully applied for the imaging and sensing of  $\text{Cu}^{2+}$  ions in living cells. For the better understanding of the roles of copper homeostasis in physiological and pathological processes, we report a graphene quantum dots (GQDs)-based two-photon ratiometric probe for imaging and sensing of  $\text{Cu}^{2+}$  in living cell and tissue with high selectivity and sensitivity, in which Nile blue A is inert to  $\text{Cu}^{2+}$  and only serves as a reference signal for providing built-in correction to avoid environmental effects, while Cu-free derivative of bovine liver copper-zinc superoxide dismutase –  $\text{E}_2\text{Zn}_2\text{SOD}$  (E designated an empty site) is designed and prepared as the unique receptor specific for  $\text{Cu}^{2+}$  because  $\text{E}_2\text{Zn}_2\text{SOD}$  can interact with  $\text{Cu}^{2+}$  with high specificity to reconstitute SOD. The remarkable analytical performance as well as the fascinating properties of GQDs, such as excellent aqueous stability, good biocompatibility, and long-term photostability, enable the imaging and sensing of  $\text{Cu}^{2+}$  in live cell and tissue at depths of 90–180  $\mu\text{m}$  by two-photon microscopy, and we further evaluate the effect of L-ascorbic acid on the intracellular  $\text{Cu}^{2+}$  binding to  $\text{E}_2\text{Zn}_2\text{SOD}$ .

**Key Words:** cupric ions, carbon nanodots, semiconductor quantum dots, ratiometric fluorescent probes, fluorescence imaging

# 目录

|                                                        |    |
|--------------------------------------------------------|----|
| 第 1 章 引言.....                                          | 1  |
| 1.1 铜离子的研究.....                                        | 1  |
| 1.1.1 铜离子的研究意义.....                                    | 1  |
| 1.1.2 铜离子的检测方法.....                                    | 1  |
| 1.1.3 铜离子的荧光分析法.....                                   | 2  |
| 1.1.3.1 小分子 $\text{Cu}^+$ 荧光探针.....                    | 2  |
| 1.1.3.2 基于蛋白质的 $\text{Cu}^+$ 荧光探针.....                 | 3  |
| 1.1.3.3 反应驱动的 $\text{Cu}^+$ 荧光探针.....                  | 4  |
| 1.1.3.4 淬灭型 $\text{Cu}^{2+}$ 荧光探针.....                 | 4  |
| 1.1.3.5 基于萘的激基缔合物与单体间转换的增强型 $\text{Cu}^{2+}$ 荧光探针..... | 5  |
| 1.1.3.6 $\text{Cu}^{2+}$ 化学剂量传感器.....                  | 5  |
| 1.1.3.7 基于纳米颗粒的 $\text{Cu}^{2+}$ 传感器.....              | 6  |
| 1.2 基于半导体量子点的荧光传感.....                                 | 6  |
| 1.3 基于染料掺杂纳米颗粒的传感.....                                 | 9  |
| 1.4 发光碳点的研究.....                                       | 10 |
| 1.4.1 碳纳米点的介绍.....                                     | 10 |
| 1.4.2 碳纳米点的合成.....                                     | 11 |
| 1.4.2.1 Top-down 方法.....                               | 12 |
| 1.4.2.2 Bottom-up 方法.....                              | 14 |
| 1.4.2.3 碳点纳米复合物.....                                   | 16 |
| 1.4.2.4 碳点表面功能化.....                                   | 17 |
| 1.4.3 发光碳点的性质.....                                     | 17 |
| 1.4.3.1 结晶属性与杂化.....                                   | 17 |
| 1.4.3.2 光学特性.....                                      | 18 |
| 1.4.3.3 细胞毒性.....                                      | 21 |
| 1.4.4 发光碳点的生物成像.....                                   | 22 |
| 1.4.5 石墨烯衍生化的发光碳.....                                  | 22 |
| 1.4.6 碳点研究总结与展望.....                                   | 23 |
| 1.5 本文的研究目的、内容与创新点.....                                | 24 |
| 1.5.1 研究目的.....                                        | 24 |
| 1.5.2 研究内容.....                                        | 25 |
| 1.5.3 创新点.....                                         | 26 |
| 第二章 基于功能化量子点的比率型荧光探针检测细胞内铜离子.....                      | 27 |
| 2.1 引言.....                                            | 27 |

|                                                         |    |
|---------------------------------------------------------|----|
| 2.2 实验部分.....                                           | 28 |
| 2.2.1 试剂与材料.....                                        | 28 |
| 2.2.2 实验仪器.....                                         | 29 |
| 2.2.3 AE-TPEA 的合成.....                                  | 29 |
| 2.2.4 PYEA 的合成.....                                     | 30 |
| 2.2.5 CdSe@PYEA-TPEA 的制备.....                           | 30 |
| 2.2.6 细胞培养.....                                         | 30 |
| 2.2.6.1 细胞复苏.....                                       | 30 |
| 2.2.6.2 细胞传代.....                                       | 30 |
| 2.2.6.3 细胞铺板.....                                       | 31 |
| 2.2.7 细胞毒性实验.....                                       | 31 |
| 2.2.8 荧光寿命测定.....                                       | 31 |
| 2.2.9 共聚焦荧光成像.....                                      | 32 |
| 2.3 结果与讨论.....                                          | 32 |
| 2.3.1 QDs@PYEA-TPEA 的表征.....                            | 32 |
| 2.3.1.1 CdSe/ZnS 量子点的表征.....                            | 32 |
| 2.3.1.2 功能有机分子的表征.....                                  | 34 |
| 2.3.1.3 QDs@PYEA-TPEA 的表征.....                          | 35 |
| 2.3.2 QDs@PYEA-TPEA 检测 $\text{Cu}^{2+}$ .....           | 36 |
| 2.3.3 QDs@PYEA-TPEA 的选择性.....                           | 38 |
| 2.3.4 CdSe@C-TPEA 的荧光稳定性.....                           | 40 |
| 2.3.5 QDs@PYEA-TPEA 的细胞毒性.....                          | 42 |
| 2.3.6 基于 QDs@PYEA-TPEA 的细胞内 $\text{Cu}^{2+}$ 成像与传感..... | 42 |
| 2.4 本章结论.....                                           | 44 |
| 第三章 基于碳纳米点复合材料的细胞内铜离子传感与比率荧光成像.....                     | 45 |
| 3.1 引言.....                                             | 45 |
| 3.2 实验部分.....                                           | 46 |
| 3.2.1 试剂与材料.....                                        | 46 |
| 3.2.2 实验仪器.....                                         | 47 |
| 3.2.3 C-dots 的合成.....                                   | 47 |
| 3.2.4 AE-TPEA 的合成.....                                  | 47 |
| 3.2.5 CdSe@SiO <sub>2</sub> 与 CdSe@C-TPEA 的制备.....      | 47 |
| 3.2.6 细胞培养.....                                         | 48 |
| 3.2.6.1 细胞复苏.....                                       | 48 |
| 3.2.6.2 细胞传代.....                                       | 48 |
| 3.2.6.3 细胞铺板.....                                       | 48 |
| 3.2.7 细胞毒性实验.....                                       | 49 |
| 3.2.8 共聚焦荧光成像.....                                      | 49 |

|                                                                                       |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.3 结果与讨论.....                                                                        | 49 |
| 3.3.1 CdSe@C-TPEA 的表征.....                                                            | 49 |
| 3.3.1.1 C-dots 的表征.....                                                               | 49 |
| 3.3.1.2 AE-TPEA 的表征.....                                                              | 51 |
| 3.3.1.3 CdSe@SiO <sub>2</sub> 的表征.....                                                | 51 |
| 3.3.1.4 CdSe@C-TPEA 的表征.....                                                          | 52 |
| 3.3.2 CdSe@C-TPEA 检测 Cu <sup>2+</sup> .....                                           | 54 |
| 3.3.3 CdSe@C-TPEA 的荧光稳定性.....                                                         | 55 |
| 3.3.4 CdSe@C-TPEA 的选择性.....                                                           | 56 |
| 3.3.5 CdSe@C-TPEA 的细胞毒性.....                                                          | 58 |
| 3.3.6 基于 CdSe@C-TPEA 的细胞内 Cu <sup>2+</sup> 成像与传感.....                                 | 59 |
| 3.4 本章结论.....                                                                         | 60 |
| 第四章 基于石墨烯量子点的双光子比率型探针荧光成像细胞和组织内的铜离子.....                                              | 61 |
| 4.1 引言.....                                                                           | 61 |
| 4.2 实验部分.....                                                                         | 62 |
| 4.2.1 试剂与材料.....                                                                      | 62 |
| 4.2.2 实验仪器.....                                                                       | 63 |
| 4.2.3 石墨烯量子点的合成.....                                                                  | 63 |
| 4.2.4 去铜超氧化物歧化酶的制备.....                                                               | 63 |
| 4.2.5 纳米复合探针 GQD@Nile-E <sub>2</sub> Zn <sub>2</sub> SOD 的制备.....                     | 63 |
| 4.2.6 线性光学实验.....                                                                     | 64 |
| 4.2.7 双光子荧光光谱与双光子作用截面.....                                                            | 64 |
| 4.2.8 荧光寿命测定.....                                                                     | 64 |
| 4.2.9 双光子显微镜.....                                                                     | 64 |
| 4.2.10 细胞培养.....                                                                      | 65 |
| 4.2.10.1 细胞复苏.....                                                                    | 65 |
| 4.2.10.2 细胞传代.....                                                                    | 65 |
| 4.2.10.3 细胞铺板.....                                                                    | 65 |
| 4.2.11 细胞毒性实验.....                                                                    | 66 |
| 4.2.12 细胞流式实验.....                                                                    | 66 |
| 4.2.13 组织切片的制备与染色.....                                                                | 67 |
| 4.3 结果与讨论.....                                                                        | 67 |
| 4.3.1 GQD@Nile-E <sub>2</sub> Zn <sub>2</sub> SOD 的表征.....                            | 67 |
| 4.3.2 GQD@Nile-E <sub>2</sub> Zn <sub>2</sub> SOD 检测 Cu <sup>2+</sup> .....           | 72 |
| 4.3.3 GQD@Nile-E <sub>2</sub> Zn <sub>2</sub> SOD 的选择性.....                           | 74 |
| 4.3.4 GQD@Nile-E <sub>2</sub> Zn <sub>2</sub> SOD 的细胞毒性.....                          | 74 |
| 4.3.5 基于 GQD@Nile-E <sub>2</sub> Zn <sub>2</sub> SOD 的细胞内 Cu <sup>2+</sup> 成像与传感..... | 77 |

|                                                                                        |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.3.6 基于 GQD@Nile-E <sub>2</sub> Zn <sub>2</sub> SOD 的组织内 Cu <sup>2+</sup> 成像与传感 ..... | 79 |
| 4.4 本章结论.....                                                                          | 82 |
| 第五章 结论与展望.....                                                                         | 83 |
| 5.1 结论.....                                                                            | 83 |
| 5.2 展望.....                                                                            | 83 |
| 致谢.....                                                                                | 85 |
| 参考文献.....                                                                              | 86 |
| 个人简历、在读期间发表的学术论文与研究成果.....                                                             | 99 |

## 第1章 引言

### 1.1 铜离子的研究

#### 1.1.1 铜离子的研究意义

铜是人体内第三丰度的微量金属元素。不仅合成化学家利用铜离子催化合成不同的化学键<sup>[1-5]</sup>，铜离子在许多生理活动中也具有极其重要的作用。由于铜离子可以在合适的电位窗口进行氧化还原反应<sup>[6]</sup>，例如  $\text{Cu}^{2+}$  可以被细胞内丰富的抗氧化剂谷胱甘肽或者生理还原剂抗坏血酸所还原，而  $\text{Cu}^+$  也可以被广泛存在的双氧所氧化<sup>[7-8]</sup>，所以铜离子既可作为辅酶因子催化生化反应（酪氨酸羟基化与黑色素的形成），也可以维持生物氧化平衡（通过超氧化物歧化酶催化降解超氧阴离子）<sup>[9-17]</sup>。

然而，细胞内铜的动态平衡发生紊乱与一些严重疾病存在某种关联<sup>[18-19]</sup>。例如，造成胚胎与神经发育受阻的门克斯病表现出铜流动受阻，而且门克斯病患者通常存活不到三年<sup>[20-21]</sup>。此外，与铜稳态失调有紧密关系的神经退行性疾病还包括阿尔茨海默氏症<sup>[22-23]</sup>、帕金森氏症<sup>[24-26]</sup>和淀粉样蛋白侧索硬化<sup>[27]</sup>。因此，细胞仍然需要通过复杂的铜摄取、转运与储存机制严格控制细胞内的铜的水平与分布。

研究者通过生物化学方法已经了解细胞是如何获得、保持、重定向和释放铜离子，同时确定了在这些活动中所涉及的关键蛋白质<sup>[13,15,17,18,27,28]</sup>。但是关于高等真核细胞尤其是与脑、心脏、肠、肝组织相关的特定细胞是如何在亚细胞层次调节铜离子的浓度以及铜的动态平衡紊乱与衰老和疾病的关系的问题仍然没有理解清楚。因此，建立一种高选择性、高灵敏度并且可以原位实时地检测细胞内铜离子的分析方法，并进一步研究铜离子的动态平衡紊乱在疾病中的作用，对于生物学和医学的发展具有重要意义<sup>[29-30]</sup>。

#### 1.1.2 铜离子的检测方法

检测铜离子的常见方法主要有分光光度法、原子吸收光谱法、原子发射光谱法、高效液相色谱法、络合滴定法、荧光光谱法、电化学法和电感耦合等离子体-质谱等。原子吸收光谱法和原子发射光谱法具有灵敏度高、选择性好、抗干扰能力强、应用范围广等优点，缺点是这些方法不能反映所测元素的价态。

分光光度法是基于物质对光的选择性吸收而建立的分析方法, 因此具有灵敏度高、操作简单、仪器价格便宜等优点。但是由于过渡金属离子之间的离子结构和离子半径差别不大, 它们在分光光度法中容易彼此干扰。电感耦合等离子体-质谱法和高效液相色谱法具有仪器价格昂贵和样品前处理复杂等缺点。化学发光法选择性较差, 不适于低浓度的生物样品的测定。电化学法主要有伏安法和极谱法, 具有灵敏、快速和简单的优点。本课题组使用差分脉冲溶出伏安法在修饰有碳纳米点与金属离子配体的玻碳电极上实现了对  $\text{Cu}^{2+}$  的高灵敏、高选择性检测, 并成功应用于鼠脑脊液中  $\text{Cu}^{2+}$  浓度的测定<sup>[31]</sup>。

针对生物试样中铜的分析, 如果只需检测铜的含量或者浓度, 可以采用高灵敏度的电感耦合等离子体-原子吸收光谱法或者电感耦合等离子体-质谱法, 因为这些方法不能得到有关铜离子空间分布和形态的信息<sup>[32]</sup>。组织化学染色法可以分析部分氧化态铜的空间分布, 但是这种方法制样繁琐, 需要样本脱水, 而且只能分析固定化细胞和组织样本<sup>[33]</sup>。放射性铜同位素法具有非常高的信噪比和非常低的检出限。但是, 细胞摄入  $^{67}\text{Cu}$  后会改变自身体系, 而且  $^{67}\text{Cu}$  的半衰期较短 (13.7 h), 可能限制某些实验设计。以上这些分析方法都已应用于生物体系中铜的检测<sup>[34]</sup>。最近, 研究者已把更多的目光投向可以检测活细胞、组织或者器官内  $\text{Cu}^{+2+}$  的小分子荧光团、化学计量剂、基于蛋白质的荧光共振能量转移体系、基于纳米颗粒或者生物酶的传感器和磁共振成像造影剂。

### 1.1.3 铜离子的荧光分析法

过去二十年, 荧光试剂得到极大的发展与应用, 具有优异特性的金属离子荧光探针、标记物和传感器也得到很大发展。虽然利用铜离子荧光探针进行活细胞成像将是研究铜的细胞生物学的一种强大工具, 但是目前使用荧光探针检测生物体系的铜离子仍然面临许多困难。例如, 在细胞质的还原性环境中, 作为主要存在形态的  $\text{Cu}^+$  能够通过电子转移或者能量转移淬灭荧光, 而且在水溶液中其容易转变为  $\text{Cu}^{2+}$  和  $\text{Cu}^0$ 。而  $\text{Cu}^{2+}$  由于具有氧化还原属性和  $d^9$  电子层结构, 其在水溶液中特别容易淬灭荧光。

#### 1.1.3.1 小分子 $\text{Cu}^+$ 荧光探针

至今, 已有三类螯合型荧光探针和一类化学剂量传感器能够荧光成像细胞内的  $\text{Cu}^+$ 。例如, 将吡啶啉发光单元与能够选择性螯合  $\text{Cu}^+$  的氮杂冠硫醚受体连接合成的 CTAP-1 荧光探针可用于细胞内  $\text{Cu}^+$  的传感<sup>[35]</sup>。在 365 nm 紫外光激发下, 该传感器选择性识别  $\text{Cu}^+$  后其荧光强度增大 4.6 倍。与高浓度的  $\text{Cu}^+$  溶液共培养后, NIH3T3 成纤维细胞内的 CTAP-1 荧光强度明显增强。通过细胞器共定

位染色实验与 X 射线荧光显微镜表征出  $\text{Cu}^+$  主要分布在这种细胞的高尔基体与线粒体内。

与此同时, Chang 课题组发展了激发发射波长均在可见光波长范围、能够成像活细胞内  $\text{Cu}^+$  的荧光探针 CS1<sup>[36-37]</sup>。该探针是由 BODIPY 荧光团与富含硫醚的受体构成, 能够选择性识别  $\text{Cu}^+$  后使荧光强度增大 10 倍。该探针不受生物体内其它金属离子 (如碱金属、碱土金属和其它 d 区金属离子) 的干扰, 并且具有皮摩尔的键合常数 ( $K_d = 3.6 \text{ pM}$ )。在共聚焦荧光成像活细胞 (HEK 293T) 实验中, 该探针成功响应细胞内  $\text{Cu}^+$  浓度的变化。使用可穿过细胞膜的  $\text{Cu}^+$  螯合剂可以迅速降低细胞内的荧光强度, 证明该荧光探针能够可逆地检测细胞内  $\text{Cu}^+$  水平的变化。该探针已经被不同实验室用于研究铜表面的抗细菌和抗真菌功能, 或者用于分析健康与疾病脑组织中金属离子的不同<sup>[38-40]</sup>。

尽管基于发光强度变化的荧光探针在分析检测中发挥重要作用, 但是在复杂体系中探针浓度及其周围环境易受到干扰, 从而导致直接检测活体内的生物小分子非常困难。而比率分析检测可以克服以上缺点, 它是通过测定目标物存在前后两个特征信号的比值进行定量分析。Chang 课题组报道的比率型  $\text{Cu}^+$  荧光探针 (RCS1) 可以检测细胞内  $\text{Cu}^+$  水平的变化。RCS1 探针具有高的选择性, 能够可逆地识别  $\text{Cu}^+$ , 并且在抗坏血酸处理鼠脑细胞或人肾细胞后该探针仍然能够检测到内源性  $\text{Cu}^+$  水平的提高<sup>[41]</sup>。

### 1.1.3.2 基于蛋白质的 $\text{Cu}^+$ 荧光探针

蛋白质工程技术的发展为化学生物学家设计具有  $\text{Cu}^+$  响应的荧光蛋白提供了工具。例如, 将一个能够键合  $\text{Cu}^+$  的结构域的融合蛋白 (通常来自铜伴侣或者  $\text{Cu}^+$  的转录因子) 分别连接青色荧光蛋白与黄色荧光蛋白, 当这个结构域螯合  $\text{Cu}^+$  时, 两个荧光蛋白之间的距离会发生改变, 进而导致比率荧光发生变化。最近的数篇论文证明这类荧光探针可用于细胞内  $\text{Cu}^+$  的灵敏检测。

Merkx 课题组巧妙地利用  $\text{Cu}^+$  能够引发铜域的二聚, 设计了由铜伴侣 Atox1 与铜外排蛋白 ATP7b 两种蛋白构成的功能蛋白, 基于荧光共振能量转移原理, 实现了  $\text{Cu}^+$  的比率荧光检测<sup>[42]</sup>。尽管该探针对于  $\text{Cu}^+$  有响应, 但是探针-金属复合物会受到谷胱甘肽与 DTT 的干扰。另外, 令人意想不到的是, 该探针对于  $\text{Zn}^{2+}$  的响应最好, 所以最终被用于构建比率型的  $\text{Zn}^{2+}$  基因编码荧光探针。而 Wegner 课题组通过使用酵母转录因子 (Amt1) 连接青色荧光蛋白与黄色荧光蛋白, 制备出了  $\text{Cu}^+$  基因编码荧光探针<sup>[43]</sup>。该探针具有非常高的  $\text{Cu}^+$  亲和力 ( $K_d = 2.5 \times 10^{-18} \text{ mol/L}$ ), 能够快速响应纳摩尔浓度变化的外源性铜, 并且具有较大的荧光比率变化。随后, 该课题组在另一个工作中利用 Ace1 (铜过量时会激活的

铜解毒基因)与 Mac1 (铜缺乏时激活的基因)的铜键合域,构建了荧光共振能量转移对<sup>[44]</sup>。

### 1.1.3.3 反应驱动的 $\text{Cu}^+$ 荧光探针

最近几年,化学剂量传感器(化学剂量传感器进行非可逆的化学反应并伴有吸光度或者荧光的变化)逐渐受到关注。基于化学剂量传感器的荧光检测是利用分析物存在时可以催化某些化学反应发生,同时引起荧光团的吸光度或者发光特性发生变化。这些化学反应既可以是简单的水解,也可以是淬灭基团的释放,亦或是复杂的金属催化成环反应导致分子共轭度增加与发光偏移。

$\text{Cu}^+$ 催化炔烃与叠氮化合物反应生成三唑是点击化学的基石,也是  $\text{Cu}^+$ 催化合成反应中最著名的一个应用<sup>[45]</sup>。Fahrni 课题组利用  $\text{Cu}^+$ 催化香豆素的炔烃残基与叠氮化合物发生反应,由于生成三唑引起香豆素荧光强度增强<sup>[46]</sup>。随后, Hulme 课题组利用相同的反应催化发光  $\text{Eu}^{3+}$ 配合物与丹酰敏化基团之间成键。这个反应可以在微摩尔浓度的谷胱甘肽存在下进行,但是该反应还没有应用到细胞内<sup>[47]</sup>。

检测细胞内  $\text{Cu}^+$ 会受到高浓度的内源性螯合剂干扰,而化学剂量传感器可以在生理浓度的谷胱甘肽存在下选择性地检测  $\text{Cu}^+$ ,使得剂量传感器成为螯合型荧光探针的有益补充。例如, Taki 课题组利用苄醚键将三[(2-吡啶基)-甲基]胺与还原型荧光素连接合成了新型的  $\text{Cu}^+$ 剂量传感器<sup>[48]</sup>。该剂量传感器先与  $\text{Cu}^+$ 螯合,然后再与氧反应生成活泼的铜-氧中间物,这个中间物会氧化降解苄醚键,释放出的双氢荧光素衍生物会被迅速氧化成绿色发光的荧光素分子。尽管上述反应是不可逆的,但是该剂量传感器的响应信号不受谷胱甘肽明显干扰,并且已成功用于细胞内  $\text{Cu}^+$ 的检测,从而进一步推动了  $\text{Cu}^+$ 荧光检测技术的进步。

### 1.1.3.4 淬灭型 $\text{Cu}^{2+}$ 荧光探针

由于  $\text{Cu}^{2+}$ 具有顺磁性,因此大部分  $\text{Cu}^{2+}$ 荧光探针是淬灭型探针,即荧光探针识别  $\text{Cu}^{2+}$ 后荧光团发生淬灭。最近一篇文章报道了淬灭型荧光探针被用于细胞内  $\text{Cu}^{2+}$ 的检测<sup>[49]</sup>。该工作利用酰胺键将吡啶甲基与香豆素衍生物连接后构成了一个可以键合  $\text{Cu}^{2+}$ 的口袋结构。Job 曲线和 X 射线晶体结构证明  $\text{Cu}^{2+}$ 与探针之间是以 1:1 配位导致荧光淬灭。该探针对其它 14 种金属离子无明显响应。细胞荧光成像实验证明在与  $\text{Cu}^{2+}$ 共培养的 LLC-MK2 细胞内该探针能够通过荧光强度减弱的方式检测细胞内  $\text{Cu}^{2+}$ 水平的升高。实际上,与增强型荧光探针相比,这种淬灭型荧光探针的时空分辨率相对不准,因为从明亮背景中的暗点得出相关结论比从黑暗背景的亮点更难。