

文章编号: 1000-7032(2024)09-1578-09

基于铁配合物的焦磷酸根离子荧光探针的构建及生物成像

陈壹刘, 宗洪凤, 李 锦, 高 妍, 肖嘉扬, 高 云*

(辽宁科技大学 化学工程学院, 辽宁 鞍山 114051)

摘要: 以萘并[2,1-b]呋喃-2-碳酰肼和4-甲酰基-3-羟基-N-丁基-1,8-萘二甲酰亚胺为原料经缩合反应制备了一种新型配体 ARC, 配体 ARC 与 Fe^{3+} 按照 1:1 络合制备了荧光探针 ARC-Fe^{3+} , 通过高分辨率质谱(HR-MS)、核磁共振氢谱(^1H NMR)对探针结构进行了表征。利用紫外-可见吸收光谱、荧光光谱等方法对 ARC-Fe^{3+} 的识别性能进行了研究。结果表明, 探针 ARC-Fe^{3+} 可通过荧光“OFF-ON”高选择、高灵敏地识别焦磷酸根离子(PPI), 探针 ARC-Fe^{3+} 识别 PPI 的检测限为 1.12×10^{-8} mol/L, 且可在 60 s 内完成对 PPI 的响应。探针 ARC-Fe^{3+} 已被成功应用于细胞和活鼠体内对 PPI 的荧光成像研究。

关键词: Fe^{3+} 配合物; 荧光探针; PPI; 细胞成像; 活鼠成像

中图分类号: O657.3; TS207.3

文献标识码: A

DOI: 10.37188/CJL.20240152

Construction and Bioimaging of PPI Fluorescent Probes Based on Iron Complexes

CHEN Yiliu, ZONG Hongfeng, LI Jin, GAO Yan, XIAO Jiayang, GAO Yun*

(College of Chemical Engineering, University of Science and Technology Liaoning, Anshan 114051, China.)

* Corresponding Author, E-mail: yuner9111@163.com.

Abstract: A novel ligand ARC was synthesized by condensation reaction of naphthalene [2,1-b] furan-2-carbohydrazide and 4-formyl-3-hydroxy-N-butyl-1,8-naphthalenediimide. The ligand ARC was synthesized by 1:1 complex reaction with Fe^{3+} . It was studied by high-resolution mass spectroscopy (HR-MS), NMR hydrogen spectroscopy (^1H NMR), UV spectroscopy, and fluorescence spectroscopy. The results showed that the probe ARC-Fe^{3+} can identify pyrophosphate with high selectivity and sensitivity through fluorescence “OFF-ON”. The detection limit of the probe ARC-Fe^{3+} to identify pyrophosphate is 1.12×10^{-8} mol/L, and the response to pyrophosphate can be completed within 60 s. The probe ARC-Fe^{3+} has been successfully applied to the fluorescence imaging of pyrophosphate in cells and living mice, so it can be applied to various fields such as food, medicine, medical treatment and environment in the future.

Key words: Fe^{3+} complex; fluorescent probe; PPI; cell imaging; live mouse imaging

1 引言

焦磷酸根离子(PPI)是一种含有两个磷酸基团的化合物,它是三磷酸腺(ATP)和磷酸腺

(ADP)的结构基础,PPI在各种代谢过程中发挥重要作用,如葡萄糖的分解和合成、调节酶的活性、生物体内的脱氧核糖核酸(DNA)和核糖核酸(RNA)聚合、细胞内ATP的水解。PPI浓度变化

收稿日期: 2024-06-14; 修订日期: 2024-06-30

基金项目: 国家自然科学基金(U1910215); 辽宁省科技厅项目(LNTP20231014607); 国家级大学生创新创业训练计划项目(202310146036); 辽宁省大学生创新创业训练计划项目(S202310146066); 辽宁科技大学大学生创新创业训练计划项目(X202310146220)

Supported by National Natural Science Foundation of China (U1910215); Liaoning Department of Science and Technology (LNTP20231014607); National Innovation and Entrepreneurship Training Program (202310146036); Liaoning Innovation and Entrepreneurship Training Program (S202310146066); Innovation and Entrepreneurship Training Program of Science and Technology University (X202310146220)

是监测或诊断多种疾病的指标,生物系统中PPi水平过高或过低可导致多种疾病的发生,包括软骨钙球菌病、焦磷酸钙沉积病(CPPD)和风湿病^[1-3]。因此,需要一种快速高效检测PPi的方法。

荧光探针技术在检测离子方面取得了显著的进展,尤其是在食品快速检测、生物医学和环境监测领域,具有操作简单、选择性高、灵敏度高、检测体系干扰小等优点。目前已经报道了多种用于检测阴、阳离子如铜离子(Cu^{2+})、铁离子(Fe^{3+})、锌离子(Zn^{2+})、次氯酸根(ClO^-)、氟离子(F^-)、硫离子(S^{2-})和硝酸根(NO_3^-)的荧光分子探针^[4-13]。荧光探针在活细胞和体内超氧阴离子的生物成像中也发挥着重要作用,能够提供关于细胞内阴离子动态变化的重要信息^[14-18]。近年来,荧光探针在食品安全、疾病诊断和环境检测等各个领域的应用取得了快速进展^[19-24]。

Chen等^[25]合成了一种用于检测PPi的NAC-CdTe量子点荧光探针,检测限为 2.8×10^{-7} mol/L。李生玲等^[26]合成了一种连续检测 Cu^{2+} 和PPi的探针,检测限为 4.5×10^{-7} mol/L。Yao等^[27]合成了一种近红外荧光探针,检测限为 2.06×10^{-7} mol/L。本研究合成了一种基于铁配合物用于检测PPi的新型荧光探针,由于PPi与 Fe^{3+} 存在的配位作用可使配体从配合物中被释放出来,使体系的荧光发生改变从而达到荧光识别PPi的目的。探针ARC- Fe^{3+} 识别PPi的检测限为 1.12×10^{-8} mol/L,可在60 s内完成对PPi的响应。因其具有响应速度快、检测限低、生物毒性小的优点,已被成功应用于细胞和活鼠体内对PPi的荧光成像研究。

2 试 验

2.1 材料与试剂

实验材料及试剂:4-溴-1,8-萘二酸酐、2-羟基-1-萘甲醛、溴乙酸乙酯、乌洛托品、正丁胺、三氟乙酸、甲醇钠、碳酸钾、水合肼、氢碘酸、乙腈、浓盐酸、冰醋酸、浓硫酸、甲醇、无水乙醇、二甲亚砜(DMSO)、氢氧化钠、乙酸乙酯、石油醚、N-2-羟乙基哌嗪-N'-2-乙磺酸(HEPES)(AR,国药集团化学试剂有限公司);硝酸钠、焦磷酸钠(PPi)、磷酸钠(Pi)、半胱氨酸(Cys)、谷胱甘肽(GSH)、高半胱氨酸(Hcy)、二十二碳六烯酸(DHA)、超氧化钾、过氧化氢(AR,阿拉丁试剂公司)

2.2 仪器与设备

实验仪器:AVANCE 500MHZ核磁共振波谱仪(瑞士BRUKER公司);6530 Q-TOF LC/MS液相

质谱联用仪(安捷伦科技公司);Lambda-900紫外分光光度计(美国P. E. 仪器公司);LS55荧光分光光度计(美国Perkin Elmer仪器公司);SPX-260生化培养箱(河南云飞科技发展有限公司);Azo-I三用紫外分析仪(顾村电光(上海)仪器厂);Start-er 3100/f pH计(奥豪斯仪器(常州)有限公司);AniView100小动物活体成像系统(广州博鹭腾生物科技有限公司);CarlZeiss LSM900激光共聚焦显微镜(北京创诚致佳科技有限公司);AR224CN电子天平(美国奥豪斯仪器公司)。

2.3 配体ARC合成

称取3-甲酰基-4-羟基-N-丁基-1,8-萘二甲酰亚胺0.297 g(1.0 mmol),萘并[2,1-b]呋喃-2-碳酰肼0.226 g(1.0 mmol)(合成参考文献[28-29]),冰醋酸(20 mL)加至50 mL圆底烧瓶中。回流10 h,抽滤,粗品经柱分离(乙酸乙酯/石油醚=3:7)得到黄色晶体ARC。收率:52.7%。¹H NMR(DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ (10^{-6}): 8.99 (s, 1 H), 8.74 (d, $J=4$ Hz, 1 H), 8.65 (s, 1 H), 8.55 (d, $J=4$ Hz, 1 H), 8.50 (s, 1 H), 8.45 (d, $J=8$ Hz, 1 H), 8.12 (d, $J=4$ Hz, 1 H), 8.07 (d, $J=4$ Hz, 1 H), 7.91~7.87 (d, 2 H), 7.74 (t, $J=4$ Hz, 1 H), 7.63 (t, $J=4$ Hz, 1 H), 4.08 (t, $J=4.5$ Hz, 2 H), 1.65~1.60 (m, 2 H), 1.40~1.34 (m, 2 H), 0.95 (t, $J=4$ Hz, 3 H)。HR-MS (positive mode m/z) for $\text{C}_{30}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_5$ [ARC+ Na^+]⁺: calcd: 528.153 6, found: 528.153 18。ARC的¹H NMR见图S1。

2.4 细胞毒性测定

在DMF/HEPES(3:7, V/V, pH=7.2, 20 mmol/L)条件下(所有测试均在该条件进行),采用标准的MTT法^[30]评估了探针ARC对HeLa细胞的毒性,并根据下面公式进行计算:细胞活力(%)=处理组空白吸光度平均值/对照组空白吸光度平均值 $\times$ 100%。

2.5 细胞成像实验

探针ARC- Fe^{3+} 在HeLa细胞内PPi的成像实验:HeLa细胞在补充有10%牛血清(FBS)、1%青霉素和1%链霉素的DMEM培养液中培养;所有的细胞在进行细胞成像实验之前,将细胞置于共聚焦小培养皿中,并在含有5% CO_2 和95%空气的37 $^{\circ}\text{C}$ 的培养箱中培养20 h,去除培养基后,细胞与含有ARC(10 $\mu\text{mol/L}$)的HEPES 0.01 mol/L、pH = 7.20溶液孵育1 h,采用PBS缓冲溶液洗两次后,

用激光扫描共聚焦显微镜在蓝色通道下成像。然后,再相继加入 $10\ \mu\text{mol/L}$ Fe^{3+} 离子处理 20 min 和 $30\ \mu\text{mol/L}$ PPI 处理 20 min, 换用新鲜的 DMEM 进行共聚焦成像。

2.6 小鼠体内荧光成像

探针 **ARC-Fe³⁺** 对小鼠体内 PPI 的成像实验: 将配体 **ARC** ($10\ \mu\text{mol/L}$, $100\ \mu\text{L}$) 皮下注射到小鼠腿部, 然后原位注射 Fe^{3+} ($5\ \text{mmol/L}$, $25\ \mu\text{L}$), 使用 $430\ \text{nm}$ 激发滤光片和 $530\ \text{nm}$ 发射滤光片记录 40, 80, 120, 160 s 时的荧光图像。再继续原位注射 PPI ($2\ \text{mmol/L}$, $25\ \mu\text{L}$), 用同样的激发滤光片和发射滤光片记录 1, 2, 3, 4 min 时的荧光图像。小鼠成像实验以空白小鼠作为对照组。

3 结果与讨论

3.1 配体 **ARC** 的表征分析

通过紫外-可见吸收光谱考查了配体 **ARC** 与 Fe^{3+} 之间的络合作用。**ARC** 的最大紫外吸收波长为 $430\ \text{nm}$ 。在 **ARC** 溶液中逐渐加入 Fe^{3+} ($0\sim 20\ \mu\text{mol/L}$) 后, **ARC** 在 $430\ \text{nm}$ 处的紫外吸收波长

开始蓝移, 且吸光度逐渐增强, 表明 **ARC-Fe³⁺** 的形成(见补充文件图 S2(b))。为了考察配体 **ARC** 与 Fe^{3+} 配位的专一性, 在 **ARC** 溶液中分别加入等量的其他常见金属离子, 包括 Mg^{2+} 、 Al^{3+} 、 Fe^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Cr^{2+} 、 Co^{3+} 、 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ag^{+} 、 Cd^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Pb^{2+} , 如图 S2(a) 所示。由图中可知 **ARC** 对其他离子并没有明显的紫外响应, 表明 **ARC** 与 Fe^{3+} 存在良好的特异性配位作用。

在 DMF/HEPES (7:3, V/V, pH = 7.2) 体系中, **ARC** 表现出较强的绿色荧光, 并能稳定保持至少 60 h (见图 S3)。而加入一定量的 Fe^{3+} 后, **ARC** 的荧光强度大幅猝灭, 如图 1 所示。当 Fe^{3+} 浓度达到 $13\ \mu\text{mol/L}$ 时, **ARC** 的荧光强度降至最低并保持不变(见右上插图), 荧光猝灭率为 88%。由 **ARC** 识别 Fe^{3+} 的 Job 图(见图 S4) 可知配体 **ARC** 荧光强度的拐点对应的 Fe^{3+} 摩尔分数为 0.5, 表明 **ARC-Fe³⁺** 配合物是以 1:1 的化学计量比络合而成。根据 **ARC** 与 Fe^{3+} 1:1 的配位模式, 利用 Benesi-Hildebrand 方程可拟合计算出 **ARC** 识别 Fe^{3+} 的缔合常数为 $1.29\times 10^5\ \text{mol/L}$ 。

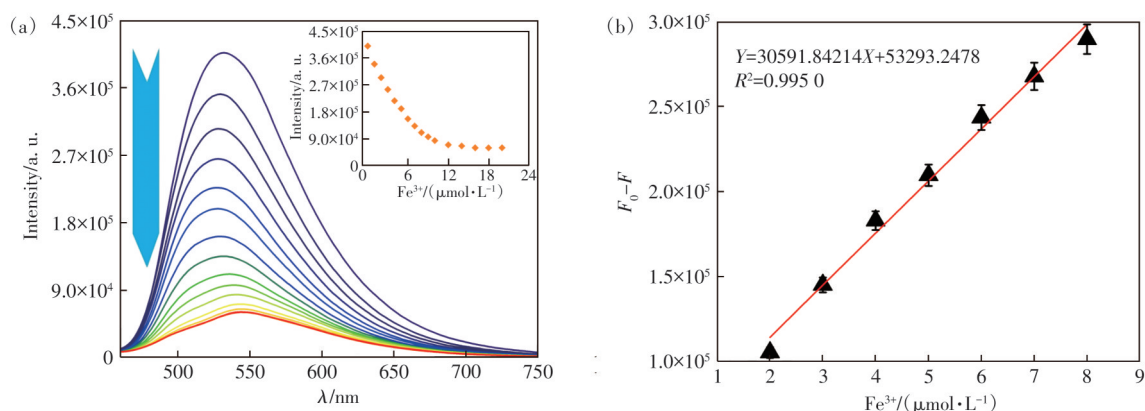


图 1 (a) 配体 **ARC** ($10\ \mu\text{mol/L}$) 识别 Fe^{3+} ($0\sim 20\ \mu\text{mol/L}$) 的荧光滴定光谱 (插图显示 **ARC** 的荧光强度随 Fe^{3+} 浓度变化曲线); (b) **ARC** ($10\ \mu\text{mol/L}$) 溶液识别 Fe^{3+} ($0\sim 9\ \mu\text{mol/L}$) 荧光极限 ($\lambda_{\text{ex}}=430\ \text{nm}$, $\lambda_{\text{em}}=530\ \text{nm}$)

Fig.1 (a) Fluorescence titration spectra of Fe^{3+} ($0\sim 20\ \mu\text{mol/L}$) identified by ligand **ARC** ($10\ \mu\text{mol/L}$) (The inset shows **ARC** fluorescence intensity with Fe^{3+} concentration curve). (b) Fluorescence limit of **ARC** ($10\ \mu\text{mol/L}$) solution to Fe^{3+} ($0\sim 9\ \mu\text{mol/L}$) ($\lambda_{\text{ex}}=430\ \text{nm}$, $\lambda_{\text{em}}=530\ \text{nm}$)

在相同的实验条件下, 通过荧光光谱考查了 **ARC** 对其他各种金属离子的识别作用。如图 S5 所示, 发现 **ARC** 对除了 Fe^{3+} 之外的其他金属离子 Mg^{2+} 、 Al^{3+} 、 Fe^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Cr^{2+} 、 Co^{3+} 、 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ag^{+} 、 Cd^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Pb^{2+} 均没有响应, 结果表明, **ARC** 可高选择性 与 Fe^{3+} 络合。然后进一步考察了 pH 对 **ARC** 络合 Fe^{3+} 的影响, 结果见图 S6。由图中可知在 pH 范围为 $5.0\sim 10.0$ 的条件下, **ARC** 的荧

光强度强而稳定, **ARC** 识别 Fe^{3+} 后在考察的 pH 范围内荧光强度大幅度降低。 **ARC-Fe³⁺** 的荧光在 pH $5.0\sim 11.0$ 范围内基本保持恒定。

3.2 探针 **ARC-Fe³⁺** 识别 PPI 的紫外-可见吸收光谱响应

采用紫外-可见吸收光谱考查了探针 **ARC-Fe³⁺** 对常见的阴离子及生物小分子的识别性能。在 DMF/HEPES (3:7, V/V, pH=7.2, $20\ \text{mmol/L}$) 的缓冲

溶液中,向探针 **ARC-Fe³⁺** (10 $\mu\text{mol/L}$)中加入各种常见的阴离子和生物小分子 Pi 、 PPi 、 H_2O_2 、 NO_2^- 、 NO_3^- 、 ONOO^- 、 $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{O}_2\cdot^-$ 、 NO 、 HcyGSH 、 Cys 、 DHA (30 $\mu\text{mol/L}$),如图 S7 所示。只有加入 PPi 后,探针 **ARC-Fe³⁺** 在 400 nm 处的最大紫外吸收波长明显红移,紫外吸光度也有所降低,当其他阴离子和生物小分子加入时探针 **ARC-Fe³⁺** 的紫外性能则完全没有影响。结果表明探针 **ARC-Fe³⁺** 可以高选择性识别 PPi 。

考查了不同浓度的 PPi 对探针 **ARC-Fe³⁺** 紫外

吸收光谱的影响。如图 2(a) 所示,随着 PPi (0 ~ 30 $\mu\text{mol/L}$) 的不断加入,探针 **ARC-Fe³⁺** 在 400 nm 处的吸光度逐渐降低。由右上插图可看出,当 PPi 浓度达到 22 $\mu\text{mol/L}$ 时,探针 **ARC-Fe³⁺** 的紫外吸光度不再变化,达到滴定终点,且紫外-可见吸收光谱与 **ARC** 的基本一致(见图 2(b)),它是由于 PPi 和探针 **ARC-Fe³⁺** 中的 Fe^{3+} 配位后使 **ARC** 重新被释放出来从而使得紫外吸收得以恢复为 **ARC** 本身的紫外-可见吸收光谱。

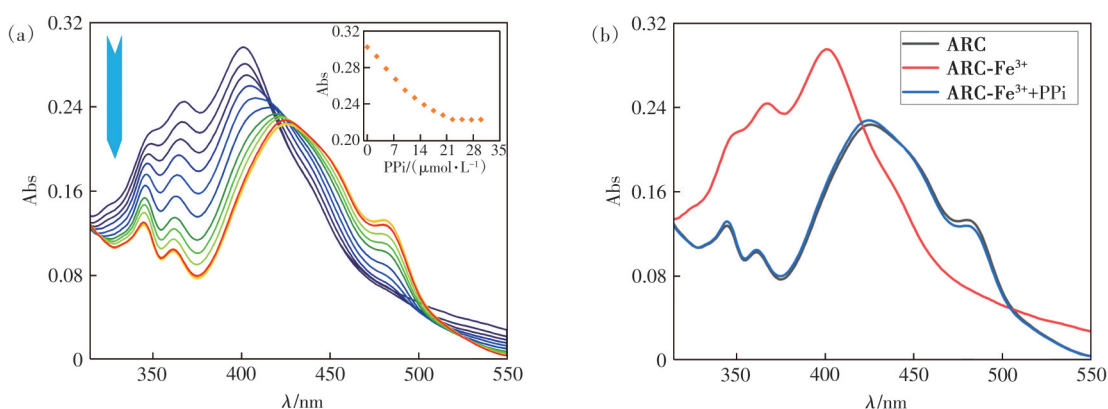


图2 (a)探针 **ARC-Fe³⁺** 识别 PPi 的紫外滴定光谱(插图显示 **ARC-Fe³⁺** 的荧光强度随 PPi 浓度变化曲线);(b)**ARC** 与 Fe^{3+} 结合后以及和 PPi 结合后的紫外可见吸收光谱

Fig. 2 (a)UV-visible titration spectroscopy of the probe **ARC-Fe³⁺** towards PPi (The inset shows that the fluorescence intensity of **ARC-Fe³⁺** varies with PPi concentration). (b)UV-Vis absorption spectra of **ARC** bound to Fe^{3+} and bound to PPi

3.3 探针 **ARC-Fe³⁺** 识别 PPi 的荧光发射光谱响应

3.3.1 探针 **ARC-Fe³⁺** 对不同阴离子的荧光响应

考查了不同阴离子及中性小分子对探针 **ARC-Fe³⁺** 荧光光谱的影响。向探针 **ARC-Fe³⁺** 中分别加入 13 种阴离子及生物小分子 Pi 、 PPi 、 H_2O_2 、 NO_2^- 、 NO_3^- 、 ONOO^- 、 $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{O}_2\cdot^-$ 、 NO 、 Hcy 、 GSH 、 Cys 、 DHA (0 ~ 30 $\mu\text{mol/L}$),由图 S8(a)可知,只有加入 PPi 后探针 **ARC-Fe³⁺** 的荧光大幅增强,其他阴离子和生物小分子对探针 **ARC-Fe³⁺** 的荧光光谱几乎没有影响。由图 S8(b)可以看出,在 365 nm 紫外灯照射下,只有加入 PPi 时探针 **ARC-Fe³⁺** 溶液的荧光由猝灭变为绿色荧光,且基本恢复到 **ARC** 的荧光水平。结果表明,探针 **ARC-Fe³⁺** 可以高选择性地识别 PPi 。

3.3.2 探针 **ARC-Fe³⁺** 对不同浓度 PPi 的荧光响应

从图 3(a)可以看出探针 **ARC-Fe³⁺** 本身几乎没有荧光,随着 PPi (0 ~ 30 $\mu\text{mol/L}$) 的浓度不断加大,探针 **ARC-Fe³⁺** 的荧光强度逐渐增强,且波长也略微发生红移。从图 3(a)的右上插图可以看

出,当加入 22 $\mu\text{mol/L}$ (2 倍当量)的 PPi 时,荧光强度达到最高,此后荧光强度不再发生变化,达到滴定平衡。由图 3(b)可知,加入 PPi 后探针 **ARC-Fe³⁺** 的荧光恢复到与 **ARC** 荧光强度基本一致。这一现象可归因于 PPi 和 Fe^{3+} 络合后使 **ARC** 从 **ARC-Fe³⁺** 配合物中被释放出来,从而使得体系荧光恢复为 **ARC** 的荧光光谱。

3.3.3 竞争离子对探针 **ARC-Fe³⁺** 识别 PPi 性能的影响

其他阴离子和生物小分子是否对探针 **ARC-Fe³⁺** 识别 PPi 的性能存在干扰,结果如图 S9 所示。向探针 **ARC-Fe³⁺** 溶液中加入除了 PPi 之外的其他阴离子和生物小分子(Pi 、 ONOO^- 、 NO_2^- 、 NO_3^- 、 $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{O}_2\cdot^-$ 、 NO 、 Hcy 、 GSH 、 Cys 、 DHA 、 H_2O_2 (2 ~ 13 号红色柱))后,荧光强度未发生明显改变。与探针 **ARC-Fe³⁺** 溶液(1 号黄色柱)相比,将 PPi 加入含有其他竞争分析物的探针 **ARC-Fe³⁺** 溶液后,其荧光强度大幅增强(2 ~ 13 号绿色柱),且与探针 **ARC-Fe³⁺** 溶液中只加入 PPi 的荧光强度几乎没有差别(1 号蓝色柱)。上述结果表明,其他竞争离

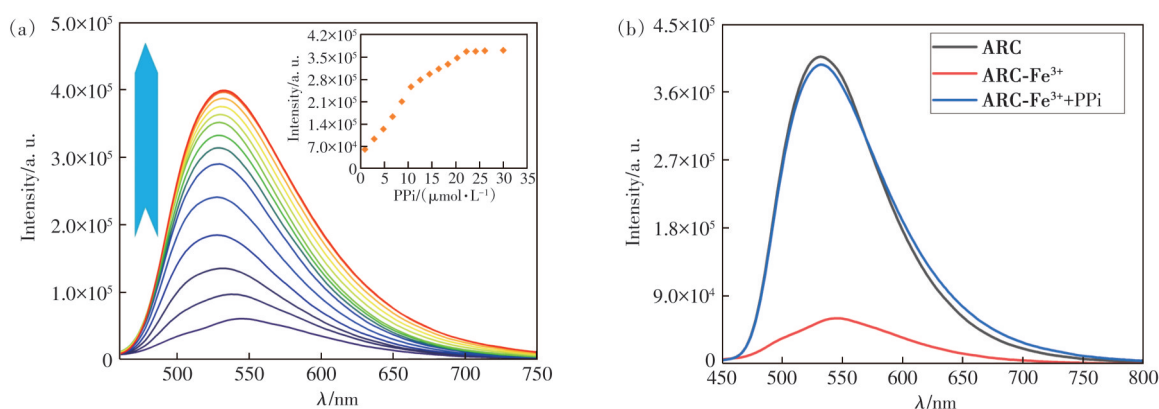


图 3 (a) 探针 ARC-Fe^{3+} (10 $\mu\text{mol/L}$) 对不同浓度 PPI (0 ~ 30 $\mu\text{mol/L}$) 的荧光滴定光谱 (插图显示 ARC-Fe^{3+} 的荧光强度随 PPI 浓度变化曲线); (b) ARC (10 $\mu\text{mol/L}$) 结合 Fe^{3+} (20 $\mu\text{mol/L}$) 和 PPI (30 $\mu\text{mol/L}$) 的荧光光谱 ($\lambda_{\text{ex}}=430\text{ nm}$)

Fig. 3 (a) Fluorometric titration spectra of the probe ARC-Fe^{3+} (10 $\mu\text{mol/L}$) towards different concentrations of PPI (0 ~ 30 $\mu\text{mol/L}$) (The inset shows that the fluorescence intensity of ARC-Fe^{3+} varies with PPI concentration). (b) Fluorescence spectra of ARC (10 $\mu\text{mol/L}$) combined with Fe^{3+} (20 $\mu\text{mol/L}$) and PPI (30 $\mu\text{mol/L}$) ($\lambda_{\text{ex}}=430\text{ nm}$)

子存在的复杂环境中, 探针 ARC-Fe^{3+} 依然可以实现对 PPI 的定性检测。

3.3.4 探针 ARC-Fe^{3+} 识别 PPI 的检测限

向探针 ARC-Fe^{3+} (10 $\mu\text{mol/L}$) 中逐渐加入 0 ~ 30 $\mu\text{mol/L}$ 的 PPI , 以 PPI 的浓度为横坐标、以 530 nm 处探针 ARC-Fe^{3+} 荧光强度的变化值为纵坐标绘制工作曲线。如图 S10 所示, 在 PPI 浓度为 2 ~ 13 $\mu\text{mol/L}$ 之间, ARC-Fe^{3+} 的荧光强度随 PPI 浓度呈线性关系 ($R^2 = 0.9958$), 通过线性拟合计算可得探针 ARC-Fe^{3+} 识别 PPI 的最低检测限为 $1.12 \times 10^{-8} \text{ mol/L}$, 由结果可知探针 ARC-Fe^{3+} 可高灵敏度地识别 PPI ^[31]。

3.3.5 探针 ARC-Fe^{3+} 识别 PPI 的 pH 稳定性和响应时间

考察了探针 ARC-Fe^{3+} 的荧光稳定性, 从图 S11 可以看出探针 ARC-Fe^{3+} 的荧光强度在 60 h 内几乎没有改变, 说明探针的荧光性能比较稳定。如图 S12(a) 所示, 探针 ARC-Fe^{3+} 在 pH 范围为 4.0 ~ 11.0 的条件下均为猝灭状态; 加入 PPI 后在 pH=5.0 ~ 11.0 范围内, 探针 ARC-Fe^{3+} 溶液的荧光强度增幅最为显著; 在考查的 pH=3.0 ~ 12.0 范围内, pH 的改变对荧光强度影响不是很大, 表明探针 ARC-Fe^{3+} 可以在较广的 pH 范围内完成对 PPI 的识别响应。如图 S12(b) 所示, 将 30 $\mu\text{mol/L}$ 的 PPI 加入到探针 ARC-Fe^{3+} (10 $\mu\text{mol/L}$) 中, 其在 530 nm 处的荧光强度在 60 s 内迅速增强并达到识别平衡, 表明探针 ARC-Fe^{3+} 可以快速识别 PPI 。

3.4 探针 ARC-Fe^{3+} 识别 PPI 机理验证

通过高分辨质谱 (HR-MS) 探究了探针 ARC-Fe^{3+}

Fe^{3+} 识别 PPI 的反应机制。如图 S13 所示, 在 528.153 18 处出现的离子峰为 $[\text{ARC}+\text{Na}]^+$ 的分子量。当 Fe^{3+} 加入 ARC 溶液中, 如图 S14 中 595.065 48 处的离子峰可归为 $[\text{ARC-H}^+ + \text{Fe}^{3+} + \text{NO}_3^-]^+$ 的分子量, ARC 与 Fe^{3+} 的 1:1 的配位模式也被验证。再将 PPI 加入化合物 ARC-Fe^{3+} 溶液后, 图 S15 中 528.152 19 处的离子峰可归为 $[\text{ARC}+\text{Na}]^+$ 的分子量。因此, 可推测探针 ARC-Fe^{3+} 识别 PPI 的响应机制如图 4 所示。

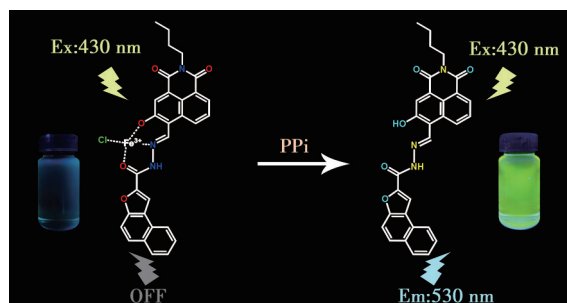


图 4 探针 ARC-Fe^{3+} 识别 PPI 响应机制

Fig. 4 Response mechanism of PPI recognition by probe ARC-Fe^{3+}

3.5 探针 ARC-Fe^{3+} 识别 PPI 细胞成像

选用 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 ARC 溶液进行细胞成像实验。首先采用 MTT 法检测 ARC 的细胞毒性, HeLa 细胞在较高浓度的 ARC (0 ~ 30 $\mu\text{mol/L}$) 孵育 24 h 后, 其存活率维持在 80% 以上 (见图 S16), 表明 ARC 具有较低的细胞毒性。

根据细胞毒性测试结果可知, ARC 毒性较低, 在此基础上考察了探针 ARC-Fe^{3+} 在 HeLa 细胞中对 PPI 的生物成像性能。从图 5 中 A 图的明

场能够清晰地看到细胞的完整形态。图5中B组图代表蓝光通道下探针识别离子的荧光响应($\lambda_{em}=530\text{ nm}$),由图中可以清晰地看出,ARC在细胞中呈现蓝色荧光;当 Fe^{3+} 进入细胞后,蓝色荧光几乎完全猝灭,在此基础上继续加入PPi后发现细胞的蓝色荧光又逐渐恢复为ARC的荧光水平。图5中C组图代表合并图像($\lambda_{em}=530\text{ nm}$)。上述实验结果表明,探针ARC- Fe^{3+} 具有低毒性和优异的细胞通透性,可在细胞内实现对PPi的共聚焦成像研究。

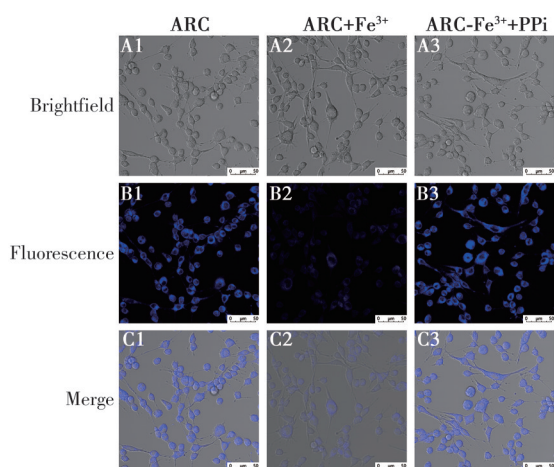


图5 在HeLa细胞中ARC($10\text{ }\mu\text{mol/L}$)识别 Fe^{3+} ($20\text{ }\mu\text{mol/L}$)和PPi($30\text{ }\mu\text{mol/L}$)的共聚焦荧光图像:(1)ARC细胞,(2)ARC- Fe^{3+} , (3)ARC- Fe^{3+} -PPi。(A)明场,(B)蓝场荧光通道。比例尺: $50\text{ }\mu\text{m}$

Fig. 5 The confocal fluorescence image of Fe^{3+} ($20\text{ }\mu\text{mol/L}$) and PPi ($30\text{ }\mu\text{mol/L}$) identified by ARC ($10\text{ }\mu\text{mol/L}$) in HeLa cells. (1) Cells with ARC, (2) ARC- Fe^{3+} , (3) ARC- Fe^{3+} -PPi. (A) Bright field, (B) blue channel. Scale bar: $50\text{ }\mu\text{m}$

3.6 探针ARC- Fe^{3+} 在小鼠体内识别PPi荧光成像

选取8周龄的C57小鼠来考察探针ARC- Fe^{3+} 对PPi的荧光成像能力。如图6(a)所示,将ARC($10\text{ }\mu\text{mol/L}$, $100\text{ }\mu\text{L}$)皮下注射到小鼠左腿上,实验发现与无荧光的空白鼠样(1)相比,注射ARC后的小鼠腿上产生明显的荧光信号;随后再将 Fe^{3+} (5 mmol/L , $25\text{ }\mu\text{L}$)原位注射到小鼠左腿上,并记录其荧光随时间变化情况。由图(2~6)可知小鼠腿上的荧光强度逐渐减弱,160 s后便基本不再变化。接着于原位处继续注射PPi(2 mmol/L , $25\text{ }\mu\text{L}$)并记录其荧光强度随时间变化情况,如图(7~10)所示,发现小鼠腿上的荧光强度又开始逐渐增强,4 min后增

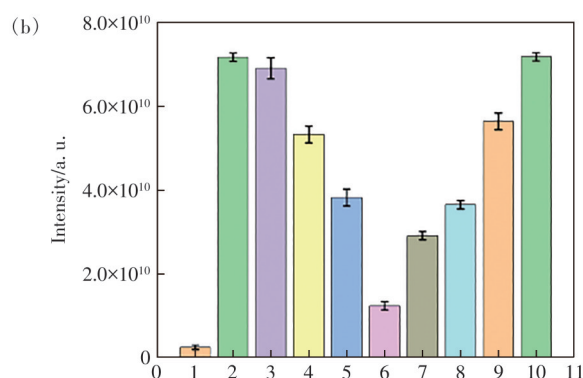
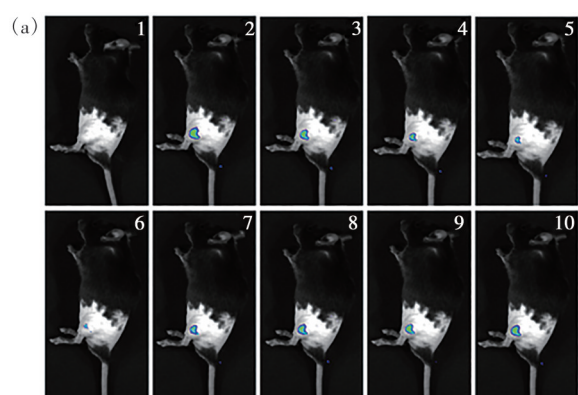


图6 (a)小鼠体内探针ARC($10\text{ }\mu\text{mol/L}$, $100\text{ }\mu\text{L}$)外源性识别 Fe^{3+} (5 mmol/L , $25\text{ }\mu\text{L}$)和PPi(2 mmol/L , $25\text{ }\mu\text{L}$)的荧光成像。(1)空白对照组;(2)小鼠左腿处皮下注射ARC;(3~6)小鼠左腿处皮下原位注射 Fe^{3+} 后在不同时间记录的荧光图像:(3)40 s,(4)80 s,(5)120 s,(6)160 s;(7~10)不同时间记录的原位继续注射PPi的荧光图像:(7)1 min,(8)2 min,(9)3 min,(10)4 min。(b)小鼠体内探针ARC外源性识别 Fe^{3+} 和PPi的平均荧光强度($\lambda_{ex}=430\text{ nm}$, $\lambda_{em}=530\text{ nm}$)

Fig. 6 (a) Fluorescence imaging of exogenous recognition of Fe^{3+} (5 mmol/L , $25\text{ }\mu\text{L}$) and PPi (2 mmol/L , $25\text{ }\mu\text{L}$) by ARC ($10\text{ }\mu\text{mol/L}$, $100\text{ }\mu\text{L}$) in mice. (1) Blank control group. (2) Mice were injected with ARC ($10\text{ }\mu\text{mol/L}$, $100\text{ }\mu\text{L}$) subcutaneously in the left leg. (3-6) Fluorescence images recorded by subcutaneous injection of Fe^{3+} (5 mmol/L , $25\text{ }\mu\text{L}$) *in situ* into the left leg of mice at different time: (3) 40 s, (4) 80 s, (5) 120 s, (6) 160 s. (7-10) Fluorescent images of continued injection of PPi at the same site recorded at different time: (7) 1 min, (8) 2 min, (9) 3 min, (10) 4 min. (b) The average fluorescence intensity of Fe^{3+} and PPi was detected by ARC in mice ($\lambda_{ex}=430\text{ nm}$, $\lambda_{em}=530\text{ nm}$)

到最强。图6(b)为注射处的平均荧光强度。小鼠活体内荧光成像证明了探针ARC- Fe^{3+} 对PPi的识别,并且具有良好的生物成像应用前景。

4 结 论

本文基于 1,8-萘酰亚胺制备了一种具有荧光特性的配体 **ARC**,通过与 Fe^{3+} 配位结合得到了可以检测 PPI 的配合物荧光探针 **ARC-Fe³⁺**,在 DMF/HEPES (3:7, V/V, pH=7.2, 20 mmol/L) 条件下,探针 **ARC-Fe³⁺** 可通过“OFF-ON”识别 PPI。其识别机理是由于 PPI 和 Fe^{3+} 络合后使 **ARC** 从 **ARC-Fe³⁺** 配合物中被释放出来,从而使得体系荧光得以恢复。通过研究证明探

针 **ARC-Fe³⁺** 具有响应速度快、抗干扰性强、毒性小等优点,识别 PPI 的检测限为 $1.12 \times 10^{-8} \text{ mol/L}$,并且探针 **ARC-Fe³⁺** 在细胞和活鼠中检测 PPI 具有良好的荧光成像效果。因此,本探针有望应用于疾病的早期诊断和治疗监测,具有潜在的应用前景。

本文补充文件和专家审稿意见及作者回复内容的下载地址:<http://cjl.lightpublishing.cn/thesisDetails#10.37188/CJL.20240152>.

参 考 文 献:

- [1] 马宁,刘玲. 焦磷酸盐在慢性肾脏病血管钙化中的研究进展 [J]. 中国当代医药, 2019, 26(29): 22-24.
MA N, LIU L. Research progress of pyrophosphate in vascular calcification of chronic kidney disease [J]. *China Mod. Med.*, 2019, 26(29): 22-24. (in Chinese)
- [2] 张梦婕,曹思敏,王梦雨,等. 铝离子对辅酶 NADH 分子荧光增强和构象变化的影响 [J]. 光谱学与光谱分析, 2021, 41(4): 997-1003.
ZHANG M J, CAO S M, WANG M Y, *et al.* Fluorescence enhancement and conformational studies of coenzyme NADH with aluminum [J]. *Spectrosc. Spectral Anal.*, 2021, 41(4): 997-1003. (in Chinese)
- [3] OBENG E, DING F, HE X J, *et al.* Bioimaging of superoxide anions in living cells and *in vivo*: perfect visualization with fluorescence probes and their applications [J]. *Dyes Pigm.*, 2022, 199: 109964.
- [4] KAUR G, SUD D. A Zn/Cd/Ni metal-organic framework-based solid and flexible fluoroprobes for highly selective detection of 4-nitroaniline in real water samples [J]. *J. Fluoresc.*, 2024, doi: 10.1007/s10895-024-03698-6.
- [5] HONG Y X, YE L Y, LONG Y, *et al.* A xanthene-based near-infrared fluorogenic probe for imaging Cu^+ and assessing ionophores in 4T1 tumor-bearing mice [J]. *Sens. Actuators B: Chem.*, 2024, 413: 135853.
- [6] ZHANG K Q, ZHAO B J, SONG Y X, *et al.* Medium-dependent selectivity for Cu^{2+} and glutathione by a near-infrared fluorescent probe [J]. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, 2024, 453: 115683.
- [7] 廖元昊,王帅,陈婉慧,等. 一种具有识别 Hg^{2+} 和 ClO^- 荧光探针的设计和应用 [J]. 发光学报, 2024, 45(2): 351-363.
LIAO Y H, WANG S, CHEN W H, *et al.* Design and application of a fluorescent probe with recognition of Hg^{2+} and ClO^- [J]. *Chin. J. Lumin.*, 2024, 45(2): 351-363. (in Chinese)
- [8] 王丹,高云玲. 基于苯并噻唑的次氯酸荧光探针的合成及应用 [J]. 分析科学学报, 2024, 40(2): 159-164.
WANG D, GAO Y L. Synthesis and application of benzothiazole-based hypochlorous acid fluorescent probe [J]. *J. Anal. Sci.*, 2024, 40(2): 159-164. (in Chinese)
- [9] 王玉,张红妮,程超,等. 罗丹明 B 酰肼席夫碱荧光探针快速检测研究 [J]. 食品工业, 2024, 45(4): 287-291.
WANG Y, ZHANG H N, CHENG C, *et al.* Rapid detection of cyanide using rhodamine B hydrazide Schiff base fluorescent probe [J]. *Food Ind.*, 2024, 45(4): 287-291. (in Chinese)
- [10] TIAN X Y, ZHANG Y, ZHANG K Z, *et al.* A novel triaminopyridine fluorescent probe based on AIE effect with high selectivity under solvent shielding effect [J]. *Microchem. J.*, 2024, 201: 110534.
- [11] 李如雪,黄明玥,周璐,等. 基于双发射碳点的荧光探针构建及对水中铜离子的检测 [J]. 发光学报, 2023, 44(10): 1872-1880.
LI R X, HUANG M Y, ZHOU P, *et al.* Construction of fluorescence probe based on carbon dots dual emission strategy and ratio detection of copper ions in water [J]. *Chin. J. Lumin.*, 2023, 44(10): 1872-1880. (in Chinese)
- [12] 张晓文,张飞. 基于分子内电荷转移的比率型荧光探针用于次氯酸检测和细胞成像 [J]. 分析实验室, 2024, 43(6): 871-875.
ZHANG X W, ZHANG F. A ratiometric fluorescent probe based on intramolecular charge transfer for hypochloric acid

- detection and cell imaging [J]. *Chin. J. Anal. Lab.*, 2024, 43(6): 871-875. (in Chinese)
- [13] LIU S Y, XU J H, MA Q J, *et al.* A rhodamine-based fluorescent probe used to determine nitroxyl (HNO) in lysosomes [J]. *Anal. Biochem.*, 2024, 692: 115552.
- [14] WANG Y R, TAN Y W, ZHANG A H, *et al.* The highly selective and sensitive fluorescence probe for detection of copper (II) ions and its bioimaging *in vitro* and *vivo* [J]. *Spectrochim. Acta Part A: Mol. Biomol. Spectrosc.*, 2024, 316: 124328.
- [15] 周日, 王晨光, 卢革宇. 用于细胞脂滴超分辨荧光成像的有机荧光探针研究进展 [J]. 中国光学(中英文), 2022, 15(6): 1228-1242.
- ZHOU R, WANG C G, LU G Y. Advances in organic fluorescent probes for super-resolution imaging of cellular lipid droplets [J]. *Chin. Opt.*, 2022, 15(6): 1228-1242. (in Chinese)
- [16] 顾亚琴, 丁劲峰, 陈金城, 等. 咪唑近红外荧光探针可视化线粒体及体内成像应用 [J]. 高等学校化学学报, 2023, 44(12): 20230367.
- GU Y Q, DING J F, CHEN J E, *et al.* Visualization of mitochondria *via* carbazole near-infrared fluorescent probe and *in vivo* imaging application [J]. *Chem. J. Chin. Univ.*, 2023, 44(12): 20230367. (in Chinese)
- [17] 王宏亮, 张晓娟, 任海仙. 线粒体靶向的次氯酸荧光探针的构建及其生物成像研究 [J]. 化学研究与应用, 2023, 35(10): 2417-2423.
- WANG H L, ZHANG X J, REN H X. Mitochondrial-targeted hypochlorous acid fluorescent probe and its bioimaging [J]. *Chem. Res. Appl.*, 2023, 35(10): 2417-2423. (in Chinese)
- [18] 贺晓梦, 袁方, 张素雅, 等. 基于尼罗红类 ONOO⁻近红外荧光探针的开发及其成像应用 [J]. 化学学报, 2023, 81(11): 1515-1521.
- HE X M, YUAN F, ZHANG S Y, *et al.* Development of a near-infrared fluorescent probe based on Nile red for ONOO⁻ and its imaging applications [J]. *Acta Chim. Sinica*, 2023, 81(11): 1515-1521. (in Chinese)
- [19] 王智瀛, 孙晓丽. 碳点荧光探针的合成及其在食品安全检测中的应用 [J]. 粮食与油脂, 2024, 37(4): 9-13.
- WANG Z Y, SUN X L. Synthesis of carbon dot fluorescent probe and its application in food safety detection [J]. *Cereals Oils*, 2024, 37(4): 9-13. (in Chinese)
- [20] 谭天, 史天悦, 吴长锋, 等. 基于间接波前整形的近红外二区荧光共聚焦成像研究 [J]. 中国光学(中英文), 2024, 17(1): 150-159.
- TAN T, SHI T Y, WU C F, *et al.* NIR-II fluorescence confocal imaging based on indirect wavefront shaping [J]. *Chin. Opt.*, 2024, 17(1): 150-159. (in Chinese)
- [21] 陈红琴, 严梦茹, 严恒, 等. 基于CDs的荧光探针在酒类等发酵食品检测中的研究进展及趋势 [J]. 光谱学与光谱分析, 2024, 44(5): 1209-1217.
- CHEN H Q, YAN M R, YAN H, *et al.* Research progress and trends of CDs-based fluorescent probes in the detection of fermented foods such as alcoholic beverages [J]. *Spectrosc. Spectral Anal.*, 2024, 44(5): 1209-1217. (in Chinese)
- [22] 韩雍, 汪慧, 杜雪蓉. 基于碳点的“开-关-开”型荧光探针测定蔬菜中的谷胱甘肽 [J]. 分析试验室, 2024, 43(5): 609-614.
- HAN Y, WANG H, DU X R. “On-off-on” fluorescent probe based on carbon dots for the detection of glutathione in vegetables [J]. *Chin. J. Anal. Lab.*, 2024, 43(5): 609-614. (in Chinese)
- [23] 莫清林, 彭帅, 何文斌, 等. 一种用于检测气态甲醛的新型荧光探针 [J]. 化学通报, 2024, 87(3): 355-360.
- MO Q L, PENG S, HE W B, *et al.* A novel fluorescent probe for the detection of gaseous formaldehyde [J]. *Chemistry*, 2024, 87(3): 355-360. (in Chinese)
- [24] 仇雨, 沈之阳, 丁海贞, 等. 近红外二区花菁染料在疾病应用中的研究进展 [J]. 中国激光, 2024, 51(3): 0307105.
- QIU Y, SHEN Z Y, DING H Z, *et al.* Research advances of NIR-II cyanine dyes in disease applications [J]. *Chin. J. Lasers*, 2024, 51(3): 0307105. (in Chinese)
- [25] CHEN W Q, CHEN T, FANG M, *et al.* Continuous detection of cobalt ions and pyrophosphates by NAC-CdTe quantum dots fluorescence probes [J]. *J. Fluoresc.*, 2024, doi: 10.1007/s10895-024-03671-3.
- [26] 李生玲, 常西亮, 孔祥鹏, 等. 可连续识别 Cu²⁺和 PPi 的荧光探针的合成及性能研究 [J]. 化学试剂, 2022, 44(3): 427-435.

- LI S L, CHANG X L, KONG X P, *et al.* A synthesis and performance study of fluorescent probe for sequential recognition of Cu^{2+} and PPI [J]. *Chem. Reagents*, 2022, 44(3): 427-435. (in Chinese)
- [27] YAO Y X, ZENG F D, MA J L, *et al.* An innovative near-infrared fluorescent probe with FRET effect for the continuous detection of Zn^{2+} and PPI with high sensitivity and selectivity, and its application in bioimaging [J]. *Spectrochim. Acta Part A: Mol. Biomol. Spectrosc.*, 2024, 309: 123837.
- [28] 王梦痕. 水杨酰肼衍生物镍金属配合物的合成、表征及模拟脲酶的催化活性研究 [D]. 武汉: 中南民族大学, 2020: 11-28.
- WANG M H. *Synthesis, Characterization and Simulation of Urease Catalytic Activity of the Nickel Complexes with Salicylhydrazide Derivative* [D]. Wuhan: South-Central University for Nationalities, 2020: 11-28. (in Chinese)
- [29] 孟梓娟. 有机小分子荧光探针的设计合成、性能研究及其生物应用 [D]. 青岛: 青岛大学, 2020: 14-21.
- MENG Z J. *Design, Synthesis and Performance of Organic Small Molecule Fluorescent Probes and Their Biological Applications* [D]. Qingdao: Qingdao University, 2020: 14-21. (in Chinese)
- [30] ARVAS B, UCAR B, ACAR T, *et al.* A new coumarin based Schiff base fluorescence probe for zinc ion [J]. *Tetrahedron*, 2021, 88: 132127.
- [31] TSUI Y K, DEVARAJ S, YEN Y P. Azo dyes featuring with nitrobenzoxadiazole (NBD) unit: a new selective chromogenic and fluorogenic sensor for cyanide ion [J]. *Sens. Actuators B: Chem.*, 2012, 161(1): 510-519.



陈壹刘(1998-),男,辽宁葫芦岛人,硕士研究生,2022年于辽宁科技大学获得学士学位,主要从事生物化工的研究。

E-mail: 793761652@qq.com



高云(1969-),女,辽宁鞍山人,硕士,教授,硕士生导师,2005年于大连工业大学获得硕士学位,主要从事食品工程、生物化工的研究。

E-mail: yuner9111@163.com