中国科学: 化学 2017 年 第 47 卷 第 8 期: 945 ~ 954
SCIENTIA SINICA Chimica chemcn.scichina.com
《中国科学》杂志社 SCIENCE CHINA PRESS
评 述 分子荧光探针专刊

共价组装类小分子荧光探针

何停停, 何海红, 罗潇, 杨泱泱*, 杨有军*

上海市化学生物学重点实验室; 华东理工大学药学院, 上海 200237
*通讯作者, E-mail: youjunyang@ecust.edu.cn; triyang@ecust.edu.cn

收稿日期: 2017-03-10; 接受日期: 2017-05-31; 网络版发表日期: 2017-07-21
国家自然科学基金(编号: 21372080, 21572061)和中央高校基本科研专项资金(编号: WY1514053, WY1516017) 资助项目

摘要 “共价组装”类反应型分子探针的核心特点是待测底物能引发两个分子片段之间的反应, 进而在检测体系原位组装出染料的推拉电子共轭链, 并产生一个高灵敏的信号. 在本课题组提出“共价组装”的概念之前, 已有多种此类探针被报道. 本文对不同时期、不同课题组的具有“共价组装”特点的典型探针和检测试剂进行了总结.

关键词 共价组装, 探针, 荧光, 传感机制, 灵敏性

1 引言

分子探针是指一类可以对某个化学信息给出特异性响应信号的功能分子[1]. 化学信息可以是分子、离子、生物大分子、亚细胞器、细胞表型等结构信息, 也可以是酸碱度、温度、黏度等非结构性信息. 响应信号同样也有很多不同的模式, 如颜色、荧光、电子顺磁共振(EPR)、核磁共振、电信号等. 由于荧光信号检测灵敏度高, 且适于在复杂体系直接应用, 因此受到应用领域, 特别是生物、医学领域的极大欢迎.

分子探针的设计开发曾经是有机化学领域的专有研究内容. 钱永健在20世纪80年代开发的各种离子探针是早期探针里的经典案例[2]. 然而, 随着研究的进展, 分子探针已经是一个多学科交叉的大研究领域, 其他不同本质的材料均被尝试用来构建分子探针. 例如, 无机金属量子点、无机碳量子点、稀土络合物、共轭高分子、荧光蛋白等众多有紫外可见吸收和荧光发射的各色材料[3]. 然而, 在本文中, 分子探针特指基于有机小分子染料的一类功能分子.

分子探针的传感思路是其核心设计思想(图1). 经过逾30年的发展, 人们提出了多种基于有机染料的小分子探针的设计思路[4,5]. 部分探针的传感机制是光物理机制, 如激发态共振能量转移[6]、光致电子转移[7]、化学键扭转[8]等. de Silva等[9]已对此类探针进行了全面的综述. 还可以通过改变染料的结构来实现信号变化. 具体方法包括: (1) 对染料的推拉电子基团化学修饰(push/pull modification)[10,11]; (2) 改变染料拉电子共轭链的共轭程度(conjugation disruption)[12,13]; (3) 通过改变染料的刚性化程度(backbone rigidification)[14,15]. 这些类探针的一个共同特点是探针自身的光学信号常会以背景信号的形式干扰检测灵敏度.

杨有军等[16]曾于2010年报道了一个一氧化氮的分子探针(**NO550**) (图2). 他们把邻苯二胺的一个氨基换成基于碳的亲核试剂, 解决了邻苯二胺类一氧化氮

引用格式: 何停停, 何海红, 罗潇, 杨泱泱, 杨有军. 共价组装类小分子荧光探针. 中国科学: 化学, 2017, 47: 945–954
He T, He H, Luo X, Yang Y, Yang Y. Small molecular fluorescent probes based on covalent assembly. *Sci Sin Chim*, 2017, 47: 945–954, doi: 10.1360/N032017-00047

© 2017 《中国科学》杂志社

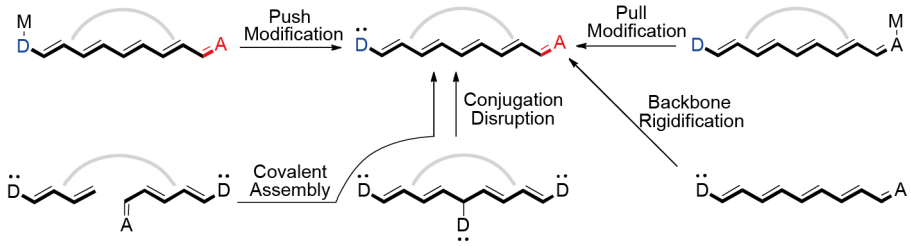


图 1 反应型探针设计思路汇总(网络版彩图)

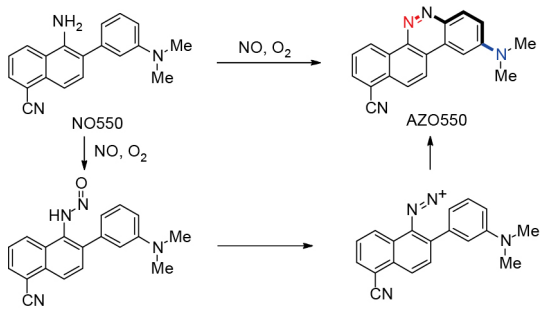


图 2 一氧化氮检测示意图(网络版彩图)

探针检测时易与α-酮酸(如脱氢抗坏血酸)反应给出干扰信号的局限性. **NO550**结构简洁, 不需要通过对染料进行修饰, 便于大量合成. 另外, 在测试时发现, 荧光产物的吸收和发射波长较探针本身的波长有大幅红移. 因此, 探针不会给检测带来背景干扰, 检测的灵敏度高. 来自探针自身的背景荧光是其他很多探针不可避免的一个局限性, 极大干扰这些探针在检测低浓度底物时的应用潜力. 因此, 作者将不同的待测底物在检测体系原位合成染料.

Wu等[17,18]利用类似的思路, 分别在2004和2005年报道了两个可以检测Cu^{2+}/Cd^{2+}的体系(图3). 先用一个配体把游离的Pd^{2+}络合掉, 使其无法引发分子内的Heck反应. 当加入Cu^{2+}或Cd^{2+}后, 它们可以将Pd^{2+}从对应的配体中置换出来, 进一步与体系中的磷配体一起催化分子内的Heck反应, 原位组装出染料的推拉电子共轭体系, 给出高灵敏的检测信号.

2010年, Kim课题组[19]设计开发了一种可以检测Au^{3+}的荧光增强型探针(图4). 在质子性溶剂中, 探针的炔基经3价金离子活化, 可发生分子内的Michael加成, 生成一个类香豆素的染料. 探针的吸收波长在263 nm, 染料的最大吸收波长在390 nm, 相比探针红移130 nm. 利用该探针可以高灵敏地选择性检测Au^{3+}, 最低检测限可以达到64 ppb.

这几个探针的共同特点是, 染料的推拉电子共轭链是由待测底物引发的级联反应在检测体系原位组装出来的. 探针不会带来背景干扰, 检测灵敏度高. 当时, 我们没有注意到有更多的类似机理, 包括Anslyn和Kim两位教授也没有利用该传感机制去设计更多的探针. 因此, 我们认为有必要把这个思路进行进一步拓展, 提高该思路的影响力.

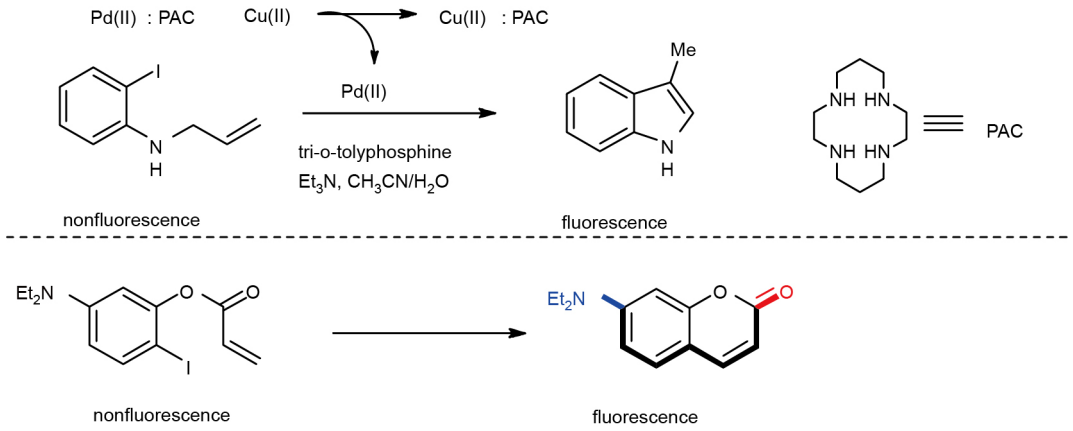


图 3 Cu^{2+}与Cd^{2+}的检测体系(网络版彩图)

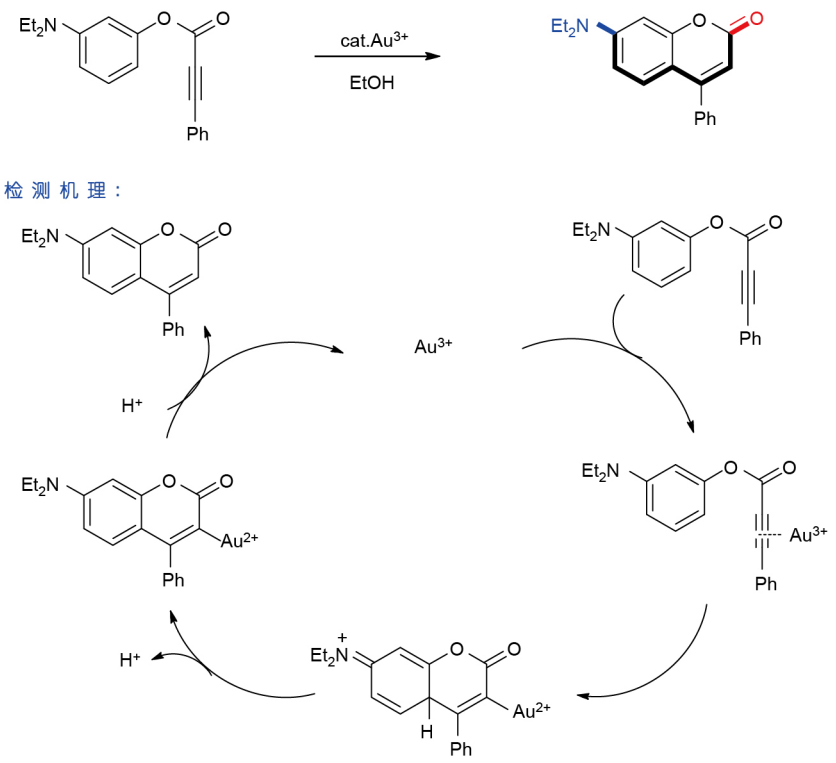


图 4　三价金离子检测的示意图(网络版彩图)

2　分子间共价组装

事实上, “共价组装”的设计思路很可能是最古老的一类传感机制之一. 早期的很多检测试剂都用到了该思路. 例如, 19世纪中叶开发的亚硝酸根检测试剂——Griess Assay, 还有20世纪六七十年代开发的甲醛、氰根、α-酮酸等的检测方法. 这几种试剂的共同特点是, 用来组装染料的两个片段是单独的两个分子. 因此, 本节的题目也命名为分子间的共价组装.

2.1　亚硝酸根检测Griess Assay

Griess assay是由Bratton和Marshall[20]于1939年开发的用来检测亚硝酸根的方法. 因其检测机理用的是Peter Griess在1879年发现的重氮化反应而得名. 其主要机理是: 亚硝酸根能在酸性条件下与对氨基苯磺酸形成重氮离子, 后与萘胺发生分子间亲电取代反应生成偶氮染料(图5). 利用紫外可见光谱检测其吸收强度可定量检测亚硝酸根. 这一方法操作简单, 有专门的试剂盒出售供使用, Griess试剂是至今为止最主要的一氧化氮检测手段之一.

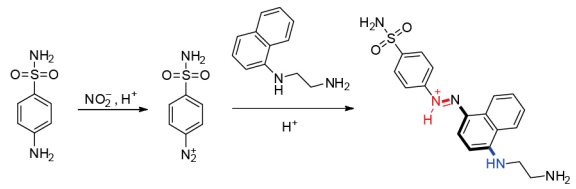


图 5　亚硝酸根检测示意图(网络版彩图)

2.2　甲醛检测

前美国卫生教育和服务部的Elbert等[21]于1961年开发了一种快速检测醛基化合物的方法. 该方法的核心机制是3-甲基-2-苯并噻唑腙(MBTH)与醛基化合物发生醛胺缩合生成希夫碱吖嗪(Azine), MBTH经氧化后生成的活性阳离子与吖嗪反应生成蓝色的甲瓒染料(图6), 在635和670 nm处有主要吸收. 这一方法对水和空气中的脂肪醛、芳香醛和杂环芳香醛都适用, 也可用于葡萄糖和胆碱氧化酶的检测.

2.3　硫氰根/氰根/吡啶离子检测

Fell课题组[22]于1972年开发了利用König反应对硫氰根/氰根/吡啶等进行荧光检测的方法. 以硫氰根

为例, 机理如下: 硫氰根被次氯酸根氧化为氯化氰和硫酸根, 氯化氰将吡啶烷基化为1-氰基吡啶盐, 再水解生成5-羟基-2,4-二烯基-1-戊醛, 然后与两分子巴比妥酸发生Aldol缩合反应(图7), 生成发射波长在560 nm的多次甲基粉色染料.

2.4 α-酮酸检测

Nakamura课题组[23]于1987年开发了利用1,2-二氨基-4,5-亚甲二氧基苯(DMB)作为高灵敏反应试剂检测α-酮酸的方法. 以唾液酸检测为例, 唾液酸化糖结合物经水解后得到游离的唾液酸, 与4,5-亚甲二氧基-1,2-苯二胺(NBD)反应后生成2, 3位取代的6,7-亚甲基二氧喹喔啉(图8), 在中性或碱性介质中均发出强烈的荧光, 发射波长约在390 nm.

2.5 烯醛检测

Nagano课题组[24]于2010年开发了一个丙烯醛探针. 探针含一个苯胺, 其紫外吸收在243 nm, 无荧光发射. 酸性加热条件下, 会与丙烯醛发生Skraup缩合反应, 生成喹啉(图9), 最大吸收波长在320 nm, 较探针红移77 nm, 并可以通过能量转移使得铕复合物发出618 nm

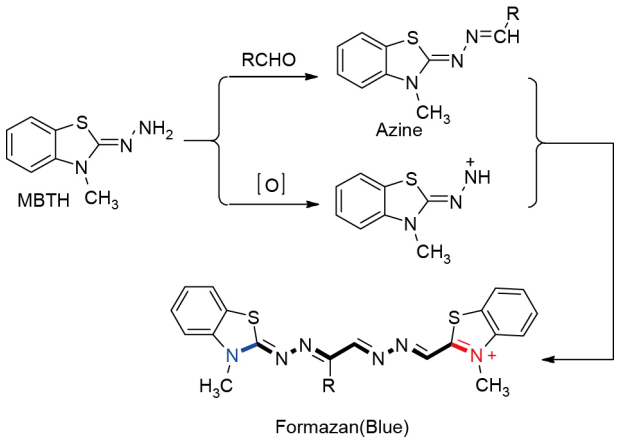


图 6 脂肪醛检测示意图(网络版彩图)

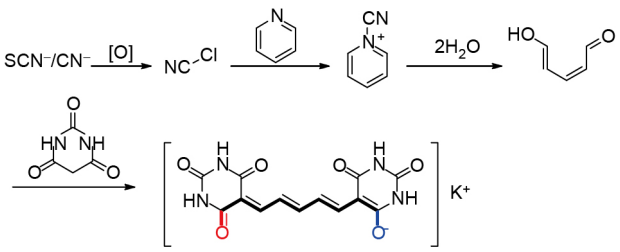


图 7 硫氰根检测示意图(网络版彩图)

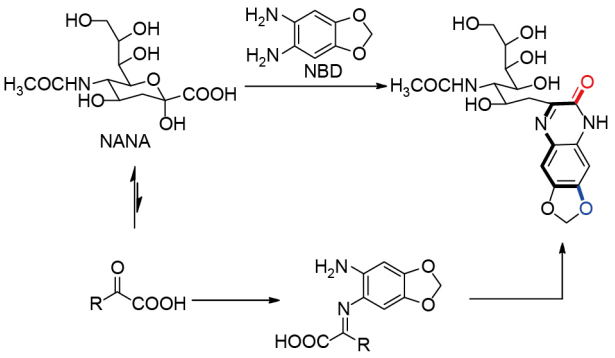


图 8 唾液酸检测示意图(网络版彩图)

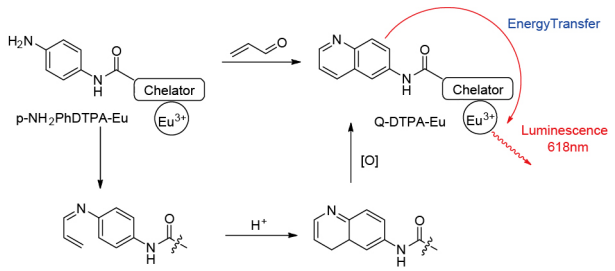


图 9 丙烯醛检测示意图(网络版彩图)

的荧光. 利用该探针可以灵敏可靠地检测血清中的丙烯醛, 检测限低至0.96 μM. 尽管喹啉不是经典的推拉电子共轭类染料, 但是该探针无疑也符合“共价组装”的思路.

2.6 辅酶检测

Kubo课题组[25]于2011年开发了一个简单快捷检测血液中辅酶Q_{10}的方法. 该方法利用2-氰基乙酰胺与泛醌(ubiquinone, CoQ_{10})或泛醇(ubiquinol, $CoQ_{10}H_2$)在碱性条件下发生Craven's反应(图10), 生成激发波长和发射波长分别在442和549 nm的荧光产物. 手指穿刺和静脉穿刺的血液经过简便的预处理后, 经高效液相色谱法(HPLC)和柱后荧光检测器的联用即可检测血液中CoQ_{10}和$CoQ_{10}H_2$的含量, 并且CoQ_{10}在0.32~1276 ng范围内呈线性响应, 检测限可以达到0.16 ng, 也可测出$CoQ_{10}H_2/CoQ_{10}$的比例作为氧化压力的生物指标.

3 分子内共价组装

当前, 分子探针更多地被用于生物体系. 这给共价组装思路的运用设置了较大的障碍. 首先, 反应需要在室温、中性缓冲溶液中发生. 同时, 对反应活性也提出了较高的要求, 因为细胞中待测底物的浓度很

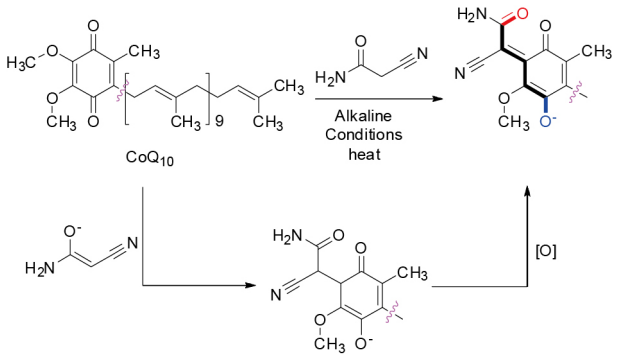


图 10　辅酶Q_{10}检测示意图(网络版彩图)

低, 往往在μM甚至nM水平. 我们利用一个连接臂连接在一起, 使分子间的反应成为分子内的反应, 提高反应速度.

3.1　过氧亚硝酸根检测

2012年, 本课题组[26]设计了一种氧化还原型荧光探针**PN660**, 可以实现过氧亚硝酸根的三通道信号检测. 探针**PN660**本身是一个发绿色荧光的香豆素衍生物, 被过氧亚硝酸根氧化, 经发橙黄色荧光的中间体**1**, 最终生成发红色荧光的产物**2**; 而次氯酸根只能将探针氧化到中间体**1**, 因此可以将其区分开. 该探针具有细胞渗透性且细胞毒性很低, 可以实现对神经胶质瘤细胞株U87的荧光成像(图11).

3.2　沙林相关的神经毒剂检测

2014年, 本课题组[27]针对沙林相关的神经毒剂设计了荧光探针**NA570**. 探针本身是一个醛基取代的二苯醚结构, 醛基的对位有强供电子基, 因此电子云密度较大, 可以被神经毒剂类化合物活化, 与强亲核性的苯胺发生分子内Vilsmeier-Haack反应, 原位生成罗丹明B染料骨架(图12). 探针**NA570**本身只有紫外区吸

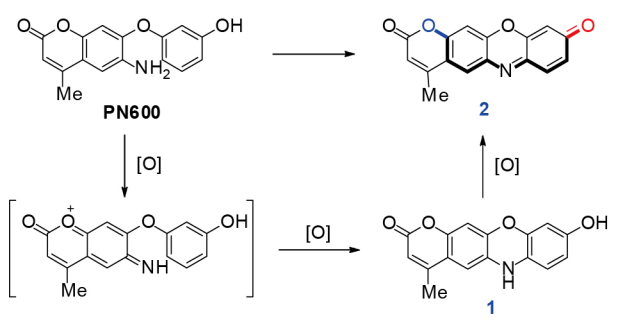


图 11　过氧亚硝酸根检测示意图(网络版彩图)

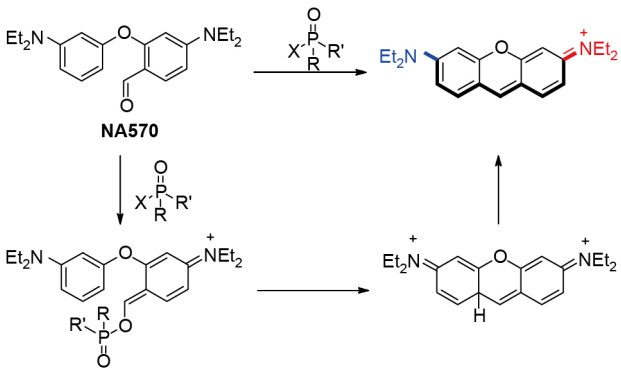


图 12　沙林相关的神经毒剂检测示意图(网络版彩图)

收, 呈无色, 而检测产物的最大吸收波长在563 nm, 呈粉红色, 可以实现在零背景下高灵敏检测神经毒剂, 得到比色及荧光信号.

3.3　二价汞离子检测

2014年, 本课题组[28]利用共价组装理念, 设计了可以检测Hg^{2+}的荧光增强型**Hg570**探针. 该探针的紫外吸收波长在265 nm, 没有荧光发射, 利用Hg^{2+}脱二硫缩醛保护基触发级联反应, 原位生成具有推拉电子骨架的罗丹明结构(图13), 其最大吸收波长可以达到552 nm, 荧光发射在570 nm, 因此可以在零背景干扰下检测Hg^{2+}.

3.4　二价汞离子及甲基汞检测

2014年, 本课题组[29]进一步利用共价组装理念设计了探针**Hg410**, 可以在水溶液中定量检测Hg^{2+}和$MeHg^{+}$, 最低检测限分别达到4.6 pM和160 pM. 探针自身的紫外吸收在273 nm, 没有荧光发射, 检测产物的最大紫外吸收波长在350 nm. 探针在设计上利用了空间近距催化, 大大提高了反应动力学, 同时根据Hg^{2+}和$MeHg^{+}$对探针有不同的反应性, 可以实现同时定量检测Hg^{2+}和$MeHg^{+}$的含量(图14).

3.5　亚硝酸根检测

2014年, 本课题组[30]进一步通过对**NO550**进行修饰, 开发了基于共价组装理念的亚硝酸根检测试剂(**NT555**), 用于检测亚硝酸根. 该探针在酸性条件下, 可以与亚硝酸根发生重氮化反应进而分子内关环得到一个苯并[c]噌啉类染料(图15). 该探针不同于传统的检测试剂如Griess试剂、2,3-二氨基萘(DAN)试剂, 利用其分子内的反应模式, 大大提高了反应动力学, 可

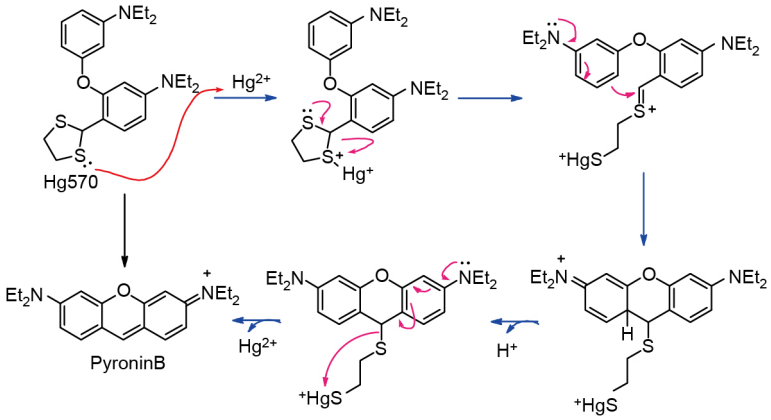


图 13 Hg^{2+}检测示意图(网络版彩图)

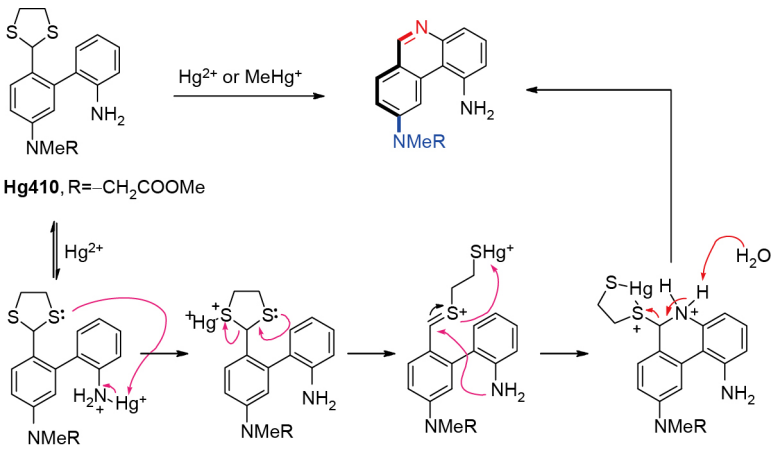


图 14 Hg^{2+}/$MeHg^{+}$检测示意图(网络版彩图)

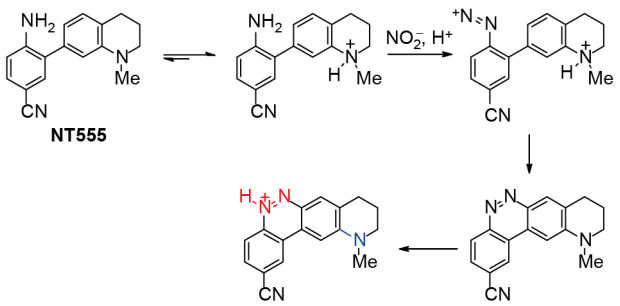


图 15 亚硝酸根检测示意图(网络版彩图)

以实现快速检测, 只需要60 s即可完成检测.

另外, 根据探针和检测产物吸收波长的不同, 可以选择470 nm去激发, 仅得到检测产物555 nm的荧光发射, 实现零背景下检测过氧亚硝酸根, 最低检测限可达到2.6 nM.

4 超分子内共价组装

另外, 我们还发现文献中有另外一类基于核酸模板的染料共价组装的离子, 用DNA/RNA模板链的识别, 拉近底物的空间距离, 从而提高有效浓度和反应速率, 实现染料(通常为菁染料)的原位组装, 实现对特定序列DNA/RNA片段进行检测. 从思路上讲, 这些案例和“分子内”共价组装是一致的, 但是这一类又确实有其特殊性, 因此将其单独列为“超分子内共价组装”. 主要方式有两种, 分为链内交联(template interstrand crosslinking)和模板链连接(template strand ligation) (图16). 第二种的转化率更好, 应用更广泛, 因而最终采用的均是模板链连接反应[20~25].

染料组装类的核酸模板反应主要为无荧光的亲核试剂与亲电试剂发生亲核加成消除反应, 生成有荧光的染料结构. 其中亲核试剂多为富电子的活性亚甲

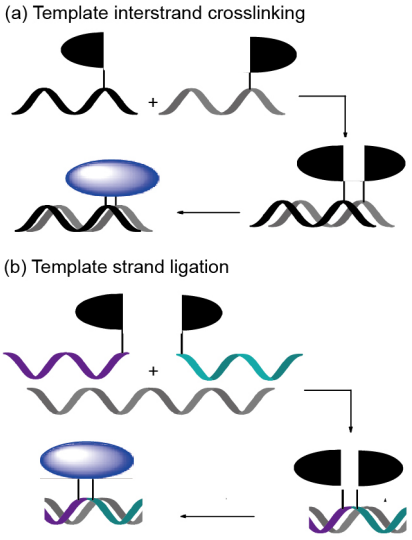


图 16　核酸模板反应分类示意图. (a) 链内交联; (b) 模板链连接(网络版彩图)

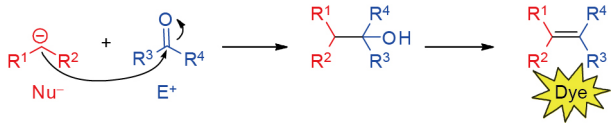


图 17　核酸模板反应通式(网络版彩图)

基, 亲电试剂为醛或酮, 反应通式如图17所示.

目前, 研究中常用到的亲核试剂和亲电试剂主要有以下几种, 如图18所示.

4.1　DNA序列的检测

Ensemble Discovery公司的Huang等[31]于2008年开发了一个用二胺催化的三甲基吲哚(**Nu1**)与苯甲醛(**E4**)的DNA模板反应. 反应底物经过生成希夫碱、亚甲基吲哚啉, 再进行质子转移、碳碳键偶联, 最终生成类半菁染料, 其最大吸收波长为550 nm, 最大发射波长为590 nm. 反应机理如图19所示.

Seitz课题组[32]于2012年利用磷酸盐(**Nu4**)和苯甲醛(**E4**)发生Witting反应生成最大发射波长为380 nm的染料结构(图20), 产生增强100倍的荧光信号. 加入环糊精染料配体后, 得到了进一步增强300倍的荧光信号. 该反应的24 h产率为83%. 这是第一个在染料的从头合成中实现基团转移的DNA模板反应.

2013年, Ladame课题组[33]利用氨基取代的苯并噻唑(**Nu3**)和吲哚乙醛(**E1**), 通过表面活性剂或双链DNA的催化, 实现了在水相中反应生成花菁类染料结构(图21). 本文详细探究了各催化剂对该反应的动力学影响, 可用来监测双链DNA的结合情况, 是潜在的DNA模板反应.

2014年, Ladame课题组[34]又利用吲哚(**Nu1**)和半方酸(**E3**)通过DNA模板反应, 生成了方酸染料(图22), 其最大吸收波长为610 nm, 最大发射波长为645 nm. 这是第一次用DNA模板反应以两个无荧光前体为原料合成近红外方酸染料, 可用于DNA检测.

4.2　DNA二级结构的检测

Ladame课题组[35]于2010年开发了一种可检测G-四联体的DNA模板反应. 只有单链DNA形成G-四联体时, 吲哚(**Nu1-2**)和吲哚乙醛(**E1**)才会发生Adol缩合反应生成花菁染料(图23), 产生荧光信号, 检测时间为2 h. 这是第一个用G-四联体DNA以“序列+结构”的特定方式进行花菁染料合成的研究.

2010年, Ladame课题组[36]通过吲哚(**Nu1**)与吲哚丁醛(**E2**)反应生成波长更长的花菁染料来检测DNA的发卡结构(图24). 文中尝试了3种模板链结合模式——旁侧序列(Hairp3)结合、发卡环顶部(Hairp2)结合及发卡环底部(Hairp1)结合. 这3种结合模式均可发生反应产生增强型荧光, 其中, 以Hairp1结合模式荧光最强(50倍).

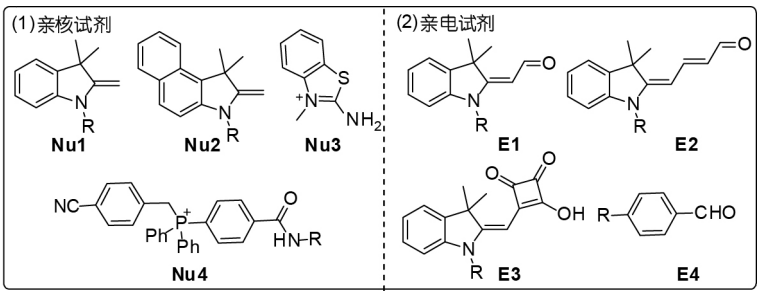


图 18　核酸模板反应常用亲核试剂/亲电试剂

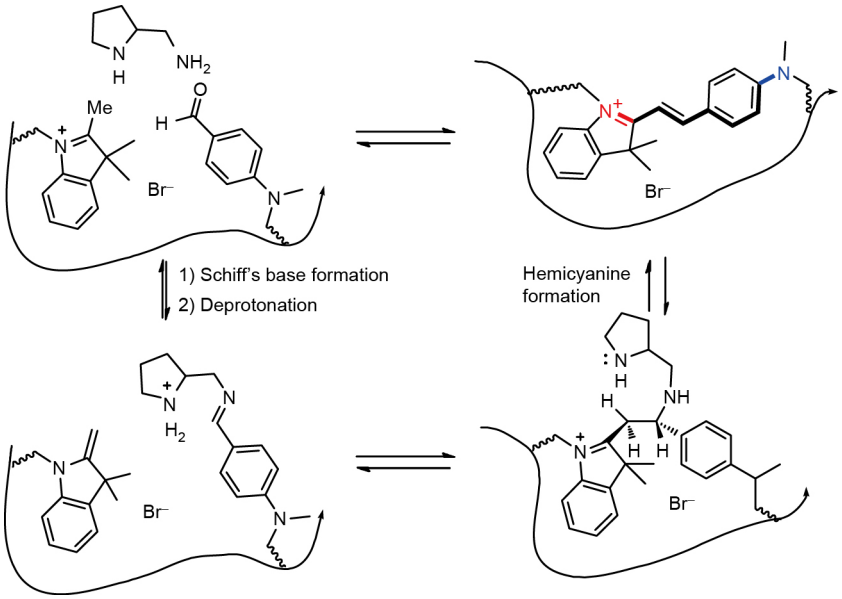


图 19 **Nu1**与**E4**反应的示意图(网络版彩图)

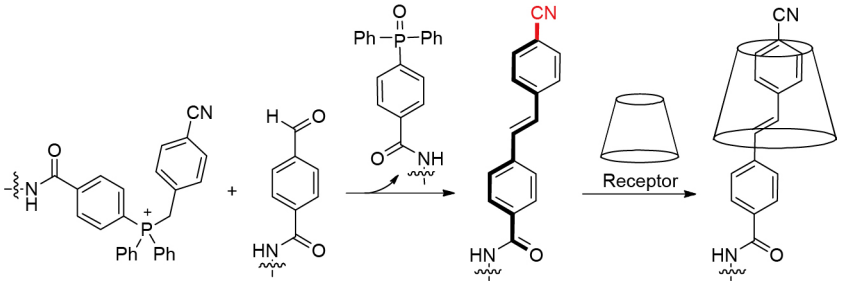


图 20 **Nu3**与**E4**反应的示意图(网络版彩图)

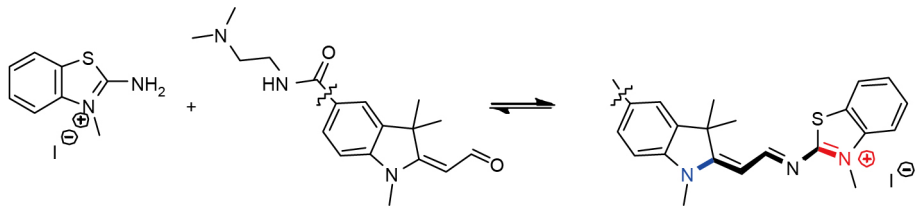


图 21 **Nu3**与**E1**反应的示意图(网络版彩图)

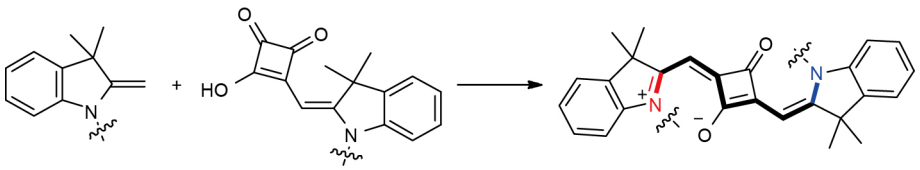


图 22 **Nu1**与**E3**反应的示意图(网络版彩图)

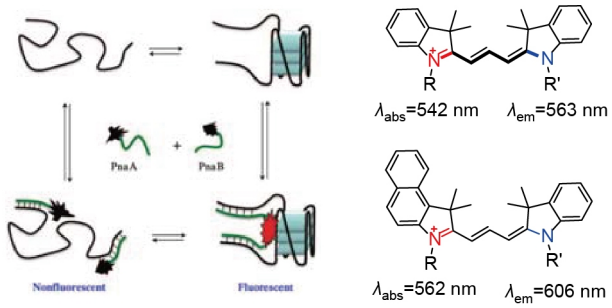


图 23　G-四联体检测的示意图(网络版彩图)

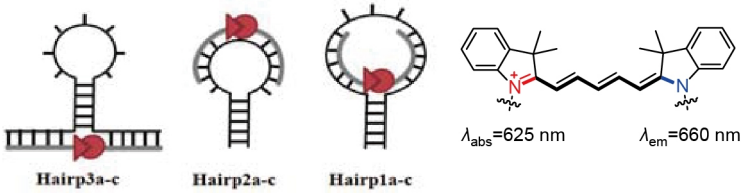


图 24　DNA发卡结构检测的示意图(网络版彩图)

5　结论

染料的共价组装是指让底物来诱发染料推拉电子共轭链的原位组装. 该方法可以避免探针带入背景荧光信号, 提高信号与背景的比值, 有利于实现高灵敏传感. 同时, 探针结构简单、合成方便, 从性质上讲, 共价组装是一条优秀的探针设计思路. 但该思路也面临着局限性, 如适用的底物范围相对较窄, 需进一步解决以满足实际需要.

参考文献

1　Wang B, Anslyn EV. *Chemosensors: Principles, Strategies, and Applications*. Hoboken: John Wiley & Sons, 2011
2　Tsien RY. *Annu Rev Neurosci*, 1989, 12: 227–253
3　Lakowicz JR. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 3rd ed. Belin: Springer, 2006
4　Ding Y, Zhu WH, Xie Y. *Chem Rev*, 2017, 117: 2203–2256
5　Ding Y, Tang Y, Zhu W, Xie Y. *Chem Soc Rev*, 2015, 44: 1101–1112
6　Andrews DL. *Chem Phys*, 1989, 135: 195–201
7　Wasielewski MR. *Chem Rev*, 1992, 92: 435–461
8　Sasaki S, Drummen GPC, Konishi G. *J Mater Chem C*, 2016, 4: 2731–2743
9　de Silva AP, Gunaratne HQN, Gunnlaugsson T, Huxley AJM, McCoy CP, Rademacher JT, Rice TE. *Chem Rev*, 1997, 97: 1515–1566
10　Ni M, Zeng WJ, Xie X, Chen ZL, Wu H, Yu CM, Li BW. *Chin Chem Lett*, 2017, 28: 1345–1351
11　Hou JR, Jin D, Chen B, Si LL, Jin YH, Chen LG, Yan XL, Wang BW, Li Y. *Chin Chem Lett*, 2017, doi: 10.1016/j.cclet.2017.03.037
12　Best QA, Xu R, McCarroll ME, Wang L, Dyer DJ. *Org Lett*, 2010, 12: 3219–3221
13　Nolting D D, Gore J C, Pham W. *Curr Org Synth*, 2011, 8: 521–534
14　Jiang W, Wang W. *Chem Commun*, 2009, 100: 3913
15　Zhu H, Fan J, Du J, Peng X. *Acc Chem Res*, 2016, 49: 2115–2126
16　Yang Y, Seidlits SK, Adams MM, Lynch VM, Schmidt CE, Anslyn EV, Shear JB. *J Am Chem Soc*, 2010, 132: 13114–13116
17　Wu Q, Anslyn EV. *J Am Chem Soc*, 2004, 126: 14682–14683
18　Wu Q, Anslyn EV. *J Mater Chem*, 2005, 15: 2815–2819
19　Do JH, Kim HN, Yoon J, Kim JS, Kim HJ. *Org Lett*, 2010, 12: 932–934
20　Bratton A C, Marshall E K Jr.. *J Bio Chem*, 1939, 128: 537–550

21 Sawicki E, Hauser TR, Stanley TW, Elbert W. *Anal Chem*, 1961, 33: 93–96
22 Pettigrew A R, Fell G S. *Clin Chem*, 1972, 18: 996–1000
23 Nakamura M, Hara S, Yamaguchi M, Takemori Y, Ohkura Y. *Chem Pharm Bull*, 1987, 35: 687–692
24 Togashi M, Urano Y, Kojima H, Terai T, Hanaoka K, Igarashi K, Hirata Y, Nagano T. *Org Lett*, 2010, 12: 1704–1707
25 Nohara Y, Suzuki J, Kubo H. *J Fluoresc*, 2011, 21: 2093–2100
26 Zhang Q, Zhu Z, Zheng Y, Cheng J, Zhang N, Long YT, Zheng J, Qian X, Yang Y. *J Am Chem Soc*, 2012, 134: 18479–18482
27 Lei Z, Yang Y. *J Am Chem Soc*, 2014, 136: 6594–6597
28 Song L, Lei Z, Zhang B, Xu Z, Li Z, Yang Y. *Anal Methods*, 2014, 6: 7597–7600
29 Zhang Z, Zhang B, Qian X, Li Z, Xu Z, Yang Y. *Anal Chem*, 2014, 86: 11919–11924
30 Shen Y, Zhang Q, Qian X, Yang Y. *Anal Chem*, 2015, 87: 1274–1280
31 Huang Y, Coull JM. *J Am Chem Soc*, 2008, 130: 3238–3239
32 Chen XH, Roloff A, Seitz O. *Angew Chem Int Ed*, 2012, 51: 4479–4483
33 Meguellati K, Fallah-Araghi A, Baret JC, El Harrak A, Mangeat T, Marques CM, Griffiths AD, Ladame S. *Chem Commun*, 2013, 49: 11332–11334
34 Sleiman MH, Ladame S. *Chem Commun*, 2014, 50: 5288–5290
35 Meguellati K, Koripelly G, Ladame S. *Angew Chem Int Ed*, 2010, 49: 2738–2742
36 Koripelly G, Meguellati K, Ladame S. *Bioconjugate Chem*, 2010, 21: 2103–2109

Small molecular fluorescent probes based on covalent assembly

Tingting He, Haihong He, Xiao Luo, Yangyang Yang*, Youjun Yang*

Shanghai Key Laboratory of Chemical Biology, School of Pharmacy, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China
**Corresponding authors (email: youjunyang@ecust.edu.cn; triyang@ecust.edu.cn)*

Abstract: "Covalent assembly" refers to a novel principle for probe design. The theme of probes via covalent assembly is the *in situ* formation of the push-pull conjugative backbone of a chromophore/fluorophore, via substrate-of-interest triggered cascade reaction. The advantage of this principle is the desired turn-on absorption/fluorescence signal from a dark background. The classic probes following the general idea of "covalent assembly" has been reviewed.

Keywords: covalent assembly, probe, fluorescence, sensing mechanism, sensitivity

doi: 10.1360/N032017-00047