

单位代码: 10293 密 级:           

南京邮电大学

专 业 学 位 硕 士 论 文



论文题目: 化学反应型光诱导电子转移荧光探针:  
合成、性质及应用

学 号	<u>1213063419</u>
姓 名	<u>翟柳青</u>
导 师	<u>赵保敏 副教授</u>
专业学位类别	<u>工程硕士</u>
类 型	<u>全 日 制</u>
专业（领域）	<u>光学工程</u>
论文提交日期	<u>2016 年 5 月</u>

# Conjugated Pi-Systems with PET Characteristics for Reaction-Based Fluorescent Probes

Thesis Submitted to Nanjing University of Posts and  
Telecommunications for the Degree of  
Master of Master of Engineering



By

Liuqing Zhai

Supervisor: Associate Prof. Baomin Zhao

May 2016

## 南京邮电大学学位论文原创性声明

本人声明所呈交的学位论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得南京邮电大学或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

本人学位论文及涉及相关资料若有不实，愿意承担一切相关的法律责任。

研究生签名：翟柳青 日期：2016.06.17

## 南京邮电大学学位论文使用授权声明

本人授权南京邮电大学可以保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子文档；允许论文被查阅和借阅；可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索；可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编本学位论文。本文电子文档的内容和纸质论文的内容相一致。论文的公布（包括刊登）授权南京邮电大学研究生院办理。

涉密学位论文在解密后适用本授权书。

研究生签名：翟柳青 导师签名：王学敏 日期：2016.06.17

## 摘要

生物体内存在多种游离物质，如小分子、自由基、离子、多肽、酶等，他们具有非常重要的生理作用；因此，对以上物质的有效检测对疾病的诊断、治疗和机理的研究显得尤为重要。过去几十年间多种传感测试手段被发展并应用于这些物质的有效、高灵敏度和高选择性检测，如毛细管电泳分离分析法、高效液相色谱法、气相色谱-质谱分析法、纳米粒子检测法、紫外-可见吸收光谱法、荧光光谱法等。基于荧光探针的荧光光谱法和荧光成像传感具有独特的优势，包括：1) 快速、灵敏；2) 无损探测；3) 信号直观易读等。荧光方法的核心在于荧光发色团，即荧光探针。在长期的荧光传感检测实践中人们发现，高效荧光探针应具有以下特点：更好的选择性；更低的检测限；更高的灵敏度；更完善的形态分析；更快的分析速度；更好的生物相容性等。

目前，荧光探针的检测机制包括荧光增强 (turn-on)、荧光淬灭 (turn-off) 和荧光共振能量转移 (FRET) 等。这些方法各有特色，多数利用的是特定荧光发色团荧光强度变化来进行定性或定量分析，且需要进行特定的标记，否则其选择性较差。发展新的检测机制，利用特殊的反应实现高选择性检测，将是一个新的挑战 and 机遇。在文献调研中，我们发现具有 donor-acceptor (D-A) 结构的有机共轭分子因分子内能量传递，其光吸收和发射通过激发态能级变化实现，表现为 (光诱导电子转移) PET 特性。然而，这类分子独特的荧光特性较少被利用于构建高效、选择性高的荧光探针。基于以上认识，我们拟定本论文的课题设计思想：构筑 D-A 共轭结构、利用具有点击化学特性的反应来实现选择性的检测，探针分子化学反应前后 D-A 结构变化形成光谱信号变化(光诱导电子转移，PET 过程)。

在充分考虑以上三方面，本论文拟分别对一氧化氮 (NO)、半胱氨酸 (Cys) 和过氧化氢 ( $H_2O_2$ ) 设计三类不同的共轭有机分子荧光探针，研究其传感特性，从而建立三种传感体系，为今后更广泛范围内实现多种生物物质传感检测的探针开发和利用奠定基础。本论文主要包括以下三个方面：

(1) 基于苄-邻苯二胺-苄结构的 NO 探针。通过 Suzuki 偶联反应，实现探针的合成，并对其结构、光物理性质进行表征确认。结果表明探针对于体外及生物体内一氧化氮都有很好的响应。此探针还具有很高的灵敏度和专一性，与 NO 作用后，其最大吸收和发射波长均表现明显的红移，同时强度也有相应变化。通过飞行时间质谱的表征，验证了荧光探针设计的合理性与可行性：当探针分子遇到一氧化氮后，芳香邻二氨基与 NO 分子发生分子内环化成三唑结构，从而使富电子的芳香胺转变成弱给电子性特性，荧光显著增强，因而能够对一氧化氮进行特异性的识别。

(2)设计合成了一种反应型半胱氨酸分子探针,并对其结构及光物理性质进行表征确认。由于氨基的吸电子影响,该探针几乎没有荧光,随着半胱氨酸的加入,探针中的马来酰亚胺与半胱氨酸发生迈克尔加成反应,PET过程被破坏,探针分子的荧光明显增高至134.7倍。该探针对半胱氨酸具有高度识别性且不受其他氨基酸的影响,实现了对半胱氨酸的高度、灵敏选择性的检测。

(3)以茚酰亚胺为荧光团,硼酸酯为识别基团设计了一种过氧化氢荧光分子探针。但是,反应合成的产物未能纯化出来,与设计实验时的预期结果是不相符的。因此,实验方案有待改进以期获得满意的结果。

**关键词:** 荧光分子探针, 荧光团, 一氧化氮, 半胱氨酸, 过氧化氢

## Abstract

There are a variety of species which play critical physiological roles in the living body, such as small molecules, free radicals, ions, peptides, enzymes, etc. Therefore, it is crucial to develop efficient detection protocols in clinic diagnosis and medicinal discovery. During the past decades, impressive progress in sensor-based detection systems with features of effectiveness, high sensitivity and high selectivity, such as capillary electrophoresis analysis (CE), high performance liquid chromatography (HPLC), UV-vis, fluorescence spectroscopy (FS) has been made. Compared to other imaging modalities, fluorescence imaging offers high spatiotemporal resolution as a largely non-invasive technique. It can probe the deeper layers of a specimen at ambient conditions and also enable spectroscopic diagnosis with chemical sensitivity. The core of fluorescence-based sensing methods is the fluorescence probes. It has been rationalized that the requirements for high performance fluorescence probes include the following characteristics: strong fluorescence signal, good biocompatibility and high sensitivity.

Generally, the detection mechanism of the fluorescent probes include fluorescence enhancement (turn-on), fluorescence quenching (turn-off) and fluorescence resonance energy transfer (FRET) and so on. These mechanisms largely depend on the changes of fluorescence intensity and emission wavelength which caused by the targets quantity. However, in many cases, these methods are non-specific or underwent tedious bio-conjugation. Thus, it is urgent and of importance to develop new detection mechanisms utilizing special reactions to achieve high selectivity detection. After carefully scanning the literatures, we found that fluorescent emission from organic semiconductors with donor-acceptor (D-A) structure are very sensitive to the D-A pair due to intramolecular energy transfer impart high influence on their optical absorptions and emissions. However, this unique fluorescence properties of these D-A dyes are seldom used fluorescence sensing systems. In this end, we put our eyes on developing dyes with specific reaction group which can finely tune the ICT effect along the whole conjugated skeleton, finally leading to sensitive fluorescent signal changes.

To evaluate our design principles, this paper intends to design three kinds of different conjugated organic molecule fluorescence probes toward nitric oxide (NO), cysteine (Cys) and hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), respectively. It is expected that our results can open new opportunities for fluorescence imaging or sensing in future biological and medical research. This thesis mainly

includes the following three sections:

(1) Phthalate diamine-fluorene-based NO probe. This probe was synthesized via a straightforward strategy of Suzuki coupling with subsequent reduction of benzo[2,1,3-b]thiadiazole. All intermediates and dye are fully characterized. The photophysical properties of the probe were investigated with UV-vis and fluorescence. The probe exhibits specific and high-speed response to nitric oxide in aqueous and in cells. As predicted by the DFT calculation, the absorption maxima and emission maxima of the probe were both changed dramatically in wavelengths and intensities by reacting with NO. The rationality and feasibility of the design of the fluorescent probe were verified by the characterization of the time of flight mass spectrometry. Through molecular simulations confirm the this strategy the theoretical feasibility and accuracy: when faced with nitric oxide molecular probes, ortho aromatic diamine and no molecule occur intramolecular formation triazole structure, so that the electron rich aromatic amine transformation into a weak electron donating properties, the fluorescence enhanced. Therefore, it can recognition specificity of nitric oxide. Confocal fluorescence imaging on Hela cell lines were also studied.

(2) PET dyes based on the reaction pair of maleimide and cysteine. Perylene, a five benzene-ring fused polycyclic aromatic hydrocarbon, always exhibits high fluorescence intensity. When maleimide group was introduced to the periphery of perylene, the probe itself shows illegible fluorescence emission. By after the “click” reaction with cysteine, Michael addition reaction happens between maleimide and cysteine, thus, the PET process is destructed, which leads to significant enhancement of fluorescence emission by 135 times. Both quantitative analysis and confocal fluorescence imaging in cells were studied. The results indicate this dye design strategy is effective and feasible.

(3) hydrogen peroxide-targeted perylene monoimide dye with boric acid ester. To specifically detection hydrogen peroxide, a new near-infrared dye with perylene monoimide as the fluorogen was designed. Due the poor solubility in common solvents and the high polarity, it is failed to obtain this probe with sufficient magnitude and quality. After tried for many entries, only few of final product was obtained, and the chemical detection of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was not conducted at this moment. Although failed, it is helpful for us to propose new dyes for this project.

**Key words:** fluorescent molecular probes, fluorescent clusters, nitric oxide, cysteine, hydrogen peroxid

# 目录

第一章 绪论 .....	1
1.1 荧光传感技术 .....	1
1.2 荧光分子探针的构成 .....	1
1.2.1 识别基团 (recognition group) .....	2
1.2.2 荧光团 (reporter group) .....	2
1.2.3 连接基团 (Spacer) .....	2
1.3 荧光探针的传感机制 .....	3
1.3.1 光诱导电子转移 (PET, pHotoinduced electron transfer) .....	3
1.3.2 分子内电荷转移 (ICT, intramolecular charge transfer) .....	5
1.3.3 激基缔合物 (excimer) .....	8
1.3.4 荧光共振能量转移 (FRET, fluorescence resonance energy transfer) .....	9
1.3.5 其他原理 .....	9
1.4 荧光探针分类 .....	10
1.4.1 上转换材料 .....	11
1.4.2 共轭聚合物 .....	12
1.4.3 半导体量子点材料 .....	13
1.4.4 金纳米颗粒、碳纳米材料 .....	15
1.5 论文研究意义及主要内容 .....	16
第二章 基于 PET 过程的一氧化氮反应型荧光探针 .....	18
2.1 分子设计 .....	18
2.2 实验部分 .....	19
2.2.1 试剂与仪器 .....	19
2.2.2 化合物的合成及结构表征 .....	20
2.2.3 探针分子性能测试 .....	23
2.3 结果与讨论 .....	23
2.3.1 可行性验证 .....	23
2.3.2 NO 对探针 A 吸收和荧光光谱的影响 .....	24
2.3.3 探针 A 检测细胞内 NO 的荧光成像实验 .....	26
2.4 本章小结 .....	27
第三章 基于 PET 过程的半胱氨酸反应型荧光探针 .....	28
3.1 分子设计 .....	28
3.2 实验部分 .....	29
3.2.1 试剂与仪器 .....	29
3.2.2 化合物的合成及结构表征 .....	30
3.2.3 探针分子性能测试 .....	32
3.3 结果与讨论 .....	32
3.3.1 含 Cys 化合物对探针 B 吸收和荧光光谱的影响 .....	32
3.3.2 探针 B 的特异性选择 .....	34
3.3.3 细胞成像 .....	35
3.4 本章小结 .....	35
第四章 基于 PET 过程的过氧化氢反应型荧光探针 .....	37
4.1 分子设计 .....	38
4.2 实验部分 .....	39
4.2.1 试剂与仪器 .....	39



4.2.2 化合物的合成及结构表征 .....	41
4.3 结果与讨论 .....	42
4.4 本章小结 .....	42
第五章 总结与展望 .....	44
5.1 总结 .....	44
5.2 展望 .....	44
参考文献 .....	46
附录 1 攻读硕士学位期间撰写的论文 .....	53
附录 2 攻读硕士学位期间申请的专利 .....	54
附录 3 攻读硕士学位期间参加的科研项目 .....	55
致谢 .....	56

# 第一章 绪论

## 1.1 荧光传感技术

传感技术作为一种前沿的技术方法，使得信息的提取方便许多。传感器则是对分析物进行响应，并且将值转换成可供读取的信息。传感器纷繁复杂，原理也大相径庭且主要分为以下两种：（一）物理传感器，运用物理方式，如热、光、磁、极化等，并将这些效应转化为可分析信号的设备；（二）化学传感器，运用化学反应前后变化，如稳定性、氧化还原性、酸性、碱性、毒性等等的变化转换为可分析信号的设备。现有的化学类传感器，占据重要地位的主要包括荧光传感器、电化学类传感器等。

荧光传感器是上世纪八十年代化学传感器的一项重要发现，将被分析对象的生物信息或化学信息转变为吸收波长、发射波长、量子产率、荧光强度和偏振光等仪器易于测量的荧光信号的装置。荧光传感器的核心在于荧光探针。人们可使用共聚焦显微镜、紫外-可见-近红外分析仪、荧光分光光度仪、流式细胞仪等仪器获得荧光探针对被测物检测的相关数据，并借助荧光影像技术对细胞、组织及生物大分子的含量和结构变化过程进行实时监控与分析，也可获得生物组织内生理代谢过程中有关信息的改变，还可实现活体的荧光成像<sup>[1]</sup>。

无论是对环境中各种有害气体和重金属的监测，还是对疾病诊断、治疗及机理的研究，都要求检测手段具备灵敏度高、特异性强等特点。荧光探针因其诸多优异性能，被广泛的应用于不同的领域，如医疗研究<sup>[2]</sup>、海洋研究、空气动力学等<sup>[3,4]</sup>。然而随着科学技术的蓬勃发展，更好的选择性；更低的检测限；更高的灵敏度；更完善的形态分析；更快的分析速度；更好的生物相容性；微损或无损分析；实时分析等<sup>[5]</sup>。所以，研究性能优异的荧光探针以应用于细胞、环境科学及生命科学等是一项非常重要的迫在眉睫的工作。

## 1.2 荧光分子探针的构成

荧光分子探针的构成：1) 目标分子的识别基团（recognition moiety）；2) 将识别的信息转化为光电信号的基团（生色团或荧光团）（reporter moiety）；3) 识别基团与荧光团之间的衔接部分（图 1.1）。其中，荧光团与识别基团分别表示宏观和微观两个层面，是现在为止研究最为广泛的部分。连接臂的作用很是关键，因为它被当作是宏观与微观连接的桥梁，关乎信号的正确表达，进而关乎整个传感器架构的优劣。研究、制备新型拥有优异性能的荧光

探针是目前分析、生命领域等研究热门之一。

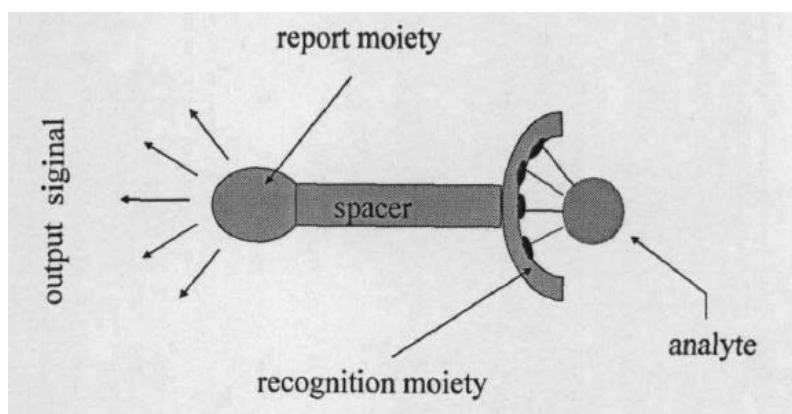


图 1.1 化学传感器结构图

### 1.2.1 识别基团 (recognition group)

特异性识别是分子探针最本质的属性，识别基团对于分析物识别的敏感性与专一性起着决定性作用。根据识别对象的不同来选择合适的识别基团，使之与识别对象发生作用，产生明显光电性质变化。在分子探针的设计中，通常识别基团包含有开链聚醚<sup>[6-8]</sup>、冠醚<sup>[9-17]</sup>、环糊精<sup>[18]</sup>、多乙烯多胺<sup>[19-21]</sup>、多肽<sup>[22,23]</sup>、杯芳烃<sup>[24,25]</sup>等。

### 1.2.2 荧光团 (reporter group)

荧光团是荧光分子探针中最基本最重要的部分之一，其作用是作为一个指标或探针来检测非荧光物质及参数，如 pH 值，活性氧或金属离子。荧光团通过光致发光特性，如荧光或磷光强度，各向异性，荧光寿命等，对体系中的化学组分做出响应。

荧光分子探针的科学研究已相当深入，但是，可是被用来检测的探针中荧光基团依然相当有限，例如金属配合物、荧光素、罗丹明、花菁、BODIPY、发荧光的有机化合物，多环芳烃类化合物等。这些荧光团自身或其衍生物都有较强的荧光量子效率，所以，寻找选择性好、灵敏度高、能用作生物检测的性能优异的荧光团，对荧光探针的研究意义深远。

### 1.2.3 连接基团 (Spacer)

连接基团在整个荧光团与识别基团两者之间起到桥梁作用。首先是识别分析物，荧光团

收到来自连接基团传递的识别信号，后经变换方式表达出为荧光信号。传递机制直接决定着信号的性能及检测的灵敏度。目前文献可查的连接方式主要是置换式和共价键两种。通常在荧光团、识别基团及连接基团组合成为新型探针时，研究者基本就能够预测出其光学性质和物质选择性。但也有例外，主要是因为荧光分子探针的设计与合成具有系统性，探针的性能与其整体的设计有很大关系。识别基团和荧光团之间用不同方式连接会产生不一样的效果，又或者受所处环境的变化(如温度 $^{\circ}\text{C}$ 、 $\text{pH}$  值等)，荧光基团的荧光性质也会发生变化。正是探针设计中各种多样性及难以预料性，其设计与合成在相当长的时间里都是研究人员的关注点之一。

### 1.3 荧光探针的传感机制

#### 1.3.1 光诱导电子转移 (PET, photoinduced electron transfer)

在检测阳离子型荧光探针中，基于 PET 原理制备出的荧光分子探针研究相对最是广泛的，荧光团常常是多环芳烃，如芘、萘等，是光吸收与发射的基团；识别基团则是具有识别功能的多胺、冠醚等基团，其作用于客体结合并将结合信息传给荧光团，且荧光强度、峰值变化都是与它的结合状态是密切相关的；将这两个部分连成一个完整的分子是连接基团的主要作用。

多数的 PET 探针分子的设计原理如图 1.2 所示，由于光诱导电子转移使母体荧光淬灭，当识别基团还没与客体结合之前，探针分子产生的荧光很微弱甚至无荧光，当识别团与客体相遇后，PET 过程则由于受到抑制或被阻断，导致了荧光团的荧光再次产生，呈现“关”，“开”状态。

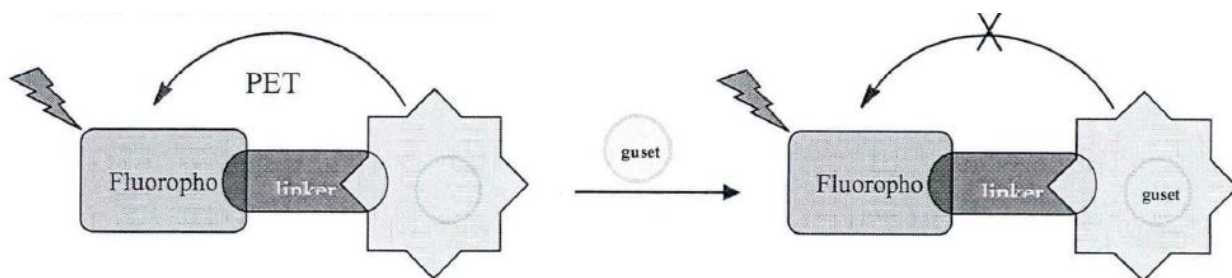


图 1.2 PET 荧光分子开关原理图

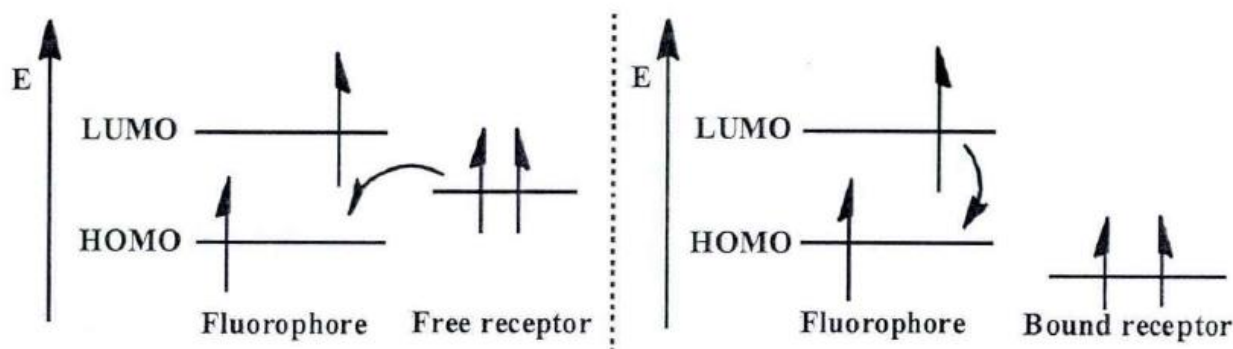


图 1.3 PET 机制的前线轨道理论

PET 导致荧光淬灭的机理可用前线轨道的理论来解释(如图)。在识别团处于自由状态时,其电子会迁移至荧光团的 HOMO 轨道,荧光团 LUMO 轨道上的电子则因不能产生跃迁回到基态,阻断了荧光的发射,进而难以产生荧光,这个过程我们称之为 PET 现象,当识别基团与客体结合后给电子能力降低,电子不能迁移至荧光团的 HOMO 轨道,使得 PET 过程不能发生,激发态的电子只能回到基态,从而荧光恢复。

Fabbrizzi, Desvergne, shinkai, Tsien 等课题组对基于 PET 过程的荧光分子探针的探索做了艰苦的努力。在已报道出的 PET 荧光分子中,荧光团多以蒽、萘、芘等具有大  $\pi$  共轭体系的基团组成,识别基团多以氮杂冠醚或脂肪氮为主。图 1.4 展现的几个 PET 荧光探针均以蒽为荧光团,分别与不一样的识别基团通过  $-\text{CO}-\text{NH}-$  或  $=\text{CH}_2$  连接。其中荧光探针一在甲醇溶液中与  $\text{K}^+$  发生络合作用,荧光产率提升了 0.137,即 46.6 倍之多<sup>[26]</sup>。探针分子 2 与  $\text{Cu}^{2+}$  或者  $\text{Ni}^{2+}$  均能络合,使它们价态升高。并且它 pH 适用范围较广泛,细胞渗透性好,在细胞成像研究上效果显著<sup>[27]</sup>。羧酸识别基团形成的空穴可对碱土金属  $\text{Mg}^{2+}$  和  $\text{Ca}^{2+}$  进行有效的螯合<sup>[28]</sup>。

大量的 PET 的构成是依据识别基团与分析物的结合进行,使 PET 过程减弱甚至阻断,从而荧光呈现“off-on”的变化。另外还有一种 PET 过程的荧光变化是“on-off”,如过渡金属因为其 3d 轨道的氧化还原性质,可使  $e^-$  在荧光团和过渡金属之间来回迁移,通过这种能量转移使得荧光发生淬灭。硫杂冠醚是探针分子 4 的识别基团,众所周知硫杂冠醚与  $\text{Cu}^{2+}$  亲和能力极强,但与其他 PET 探针表现差异的是,当与  $\text{Cu}^{2+}$  配位以后,发生了电子从荧光团转移到金属离子的奇怪现象,使探针分子的荧光淬灭<sup>[29]</sup>。这即是 desivla 介绍的另一种 PET 过程形式即“on-off”开关。

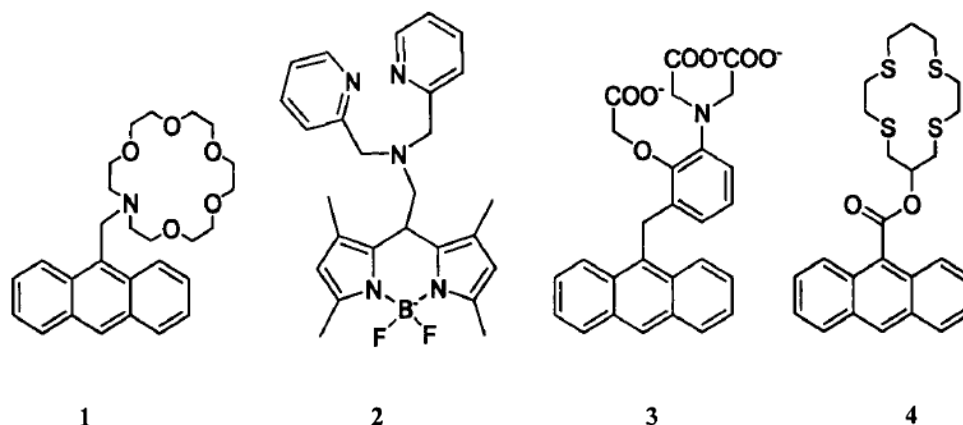


图 1.4 PET 荧光探针

基于 PET 过程的探针既能发现阳离子，又能辨别中性分子。日本的 Nagano 课题组就基于 PET 过程构建了可以识别一氧化氮及单线态氧的荧光探针。DAMBO-P<sup>H</sup><sub>[30]</sub>在光照后，从 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>到吡咯环电子迁移，使荧光消失，其荧光产率仅为千分之二。但 DAMBO-PH 与一氧化氮反应，PET 过程减弱以致阻断，荧光再次产生，DAMBO-PH-T 荧光产率高达百分之七十四。

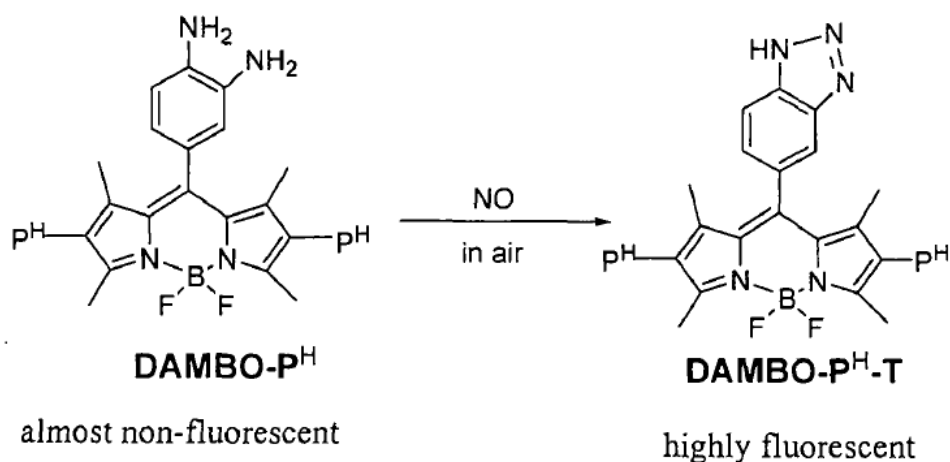


图 1.5 特性性识别 NO 的 PET 荧光探针

### 1.3.2 分子内电荷转移 (ICT, intramolecular charge transfer)

大共轭(D- $\pi$ -A 结构)的分子一般都会有存在很强的分子内电荷迁移作用。分子受光激发，能量较高的电子状态极不稳定，易迁移或离域而致使电荷分离，即为 ICT 状态并使得处于激发态分子的偶极矩变大，所以共轭结构得以加强。

吸、供电子基团分布在荧光团的左右两边，由荧光团两边的两种电子基团组成识别基团，

与之通过共轭连接。光激发荧光团后，分子内的电子将从荧光团转移到识别基团，体系微环境也因偶极距的改变而发生变化，表现波长的蓝移或红移。（如图 1.6 所示）。

例如，当探针分子荧光团的受体与提供 e<sup>-</sup>处在同一端时，受体供电子能力下降，而当受体位于吸电子一边，体系的接纳 e<sup>-</sup>本领将提高，体系的共轭程度也会随之加强，吸收光谱相应红移，荧光寿命与产率也都随之发生变化，且这些光物理性质变化强度取决于分析物及电荷数量。

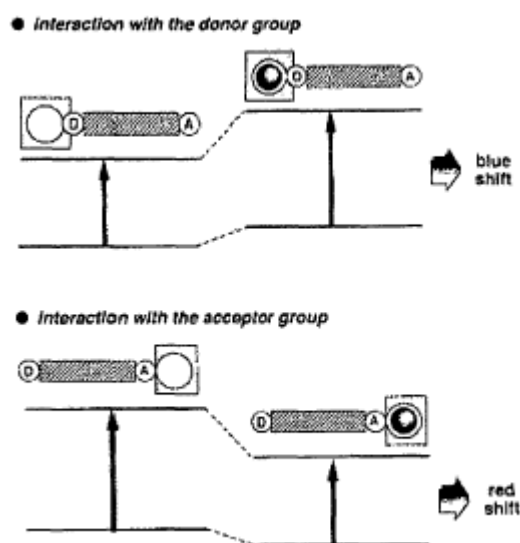


图 1.6 ICT 荧光分子探针识别原理

分子探针五是具有代表性的 ICT 类型探针<sup>[31]</sup>，其中氮杂冠醚不仅是电子给体，还是识别团。分子探针六的识别基团是其电子受体<sup>[32]</sup>，分子中氮杂冠醚与二甲氨基都是电子给体，冠醚和  $\text{Ca}^{2+}$  络合后，冠醚吸电子能力显著变强，荧光随之红移。分子探针七中的香豆素和苯并冠醚通过氧桥连接，与钙离子接触之后吸收波长发生红移，荧光强度略降低<sup>[33]</sup>。而分子探针 8 与众不同，当与  $\text{Li}^+$  络合后，吸电子能力明显有提高，荧光可增至原来的 90 倍，其中与  $\text{Mg}^{2+}$  络合后其荧光强度增大高至 2250 倍<sup>[34]</sup>。

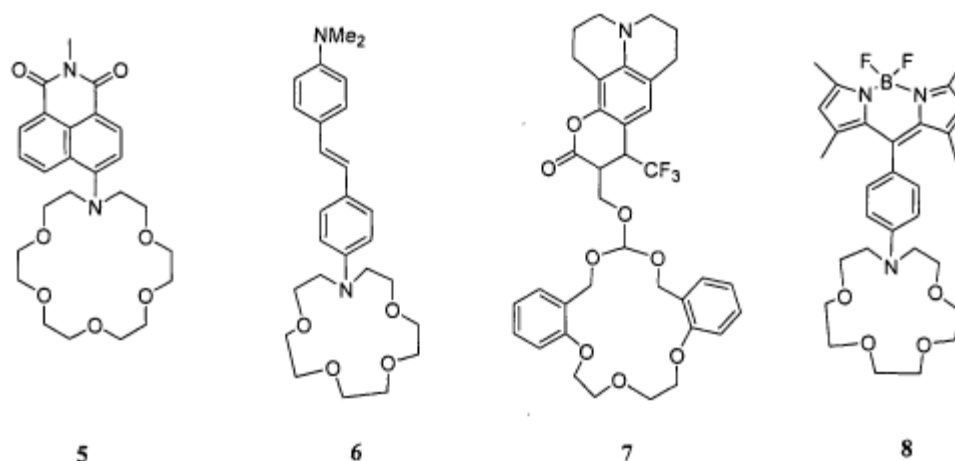


图 1.7 ICT 荧光分子探针

在 ICT 体系中,存在一种被称为扭曲分子内电荷转移(Twisted intramolecular charge transfer, TICT) 的情况。电子给体在原与芳环共平面的状态下扭转为与芳环正交状态。

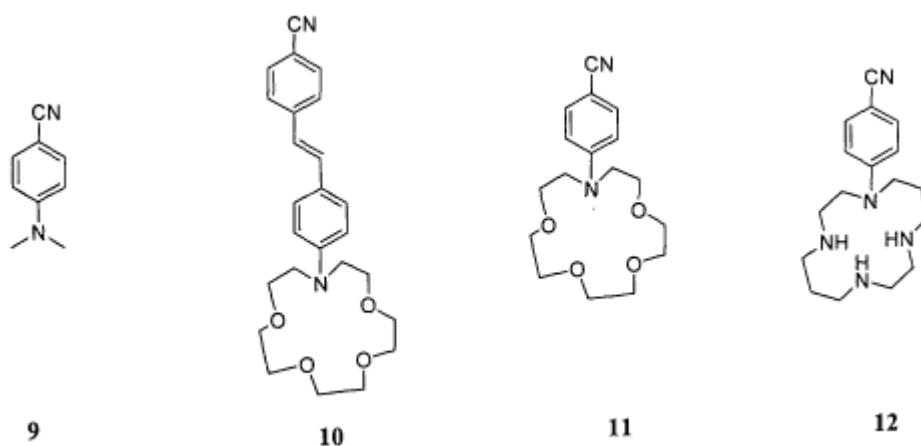


图 1.8 TICT 荧光探针

TICT 态常常具有很微弱的荧光甚至无荧光，个别时候存在 TICT 和 ICT 重复荧光<sup>[35]</sup>的现象。分子探针 9 是经典的具有双荧光分子的探针<sup>[36]</sup>，以此物质为基础的衍生物很多情况下被用于 TICT 双荧光纷繁复杂的科学探索中<sup>[37-38]</sup>。分子探针 10 是单重荧光探针<sup>[39]</sup>。分子探针 11 则是双重荧光<sup>[40]</sup>，其中部分激发态形成了波长较短的发射带，TICT 态却与之相反，分子中氮杂冠醚和正电荷离子彼此结合后，长波发射强度降低。分子探针 12 展现了十分特别的三重荧光<sup>[41]</sup>，光激发分子探针 12 的状态下 TICT 态是不产生荧光的<sup>[42]</sup>，当  $H^+$  和  $Ag^+$  发生络合时，此类金属阳离子使其 TICT 态的形成得到抑制，从而荧光恢复。



### 1.3.3 激基缔合物 (excimer)

两个及以上的同一荧光团（如，芘、蒽等）连接在识别基团的相应位置，当 1 个荧光团受激后则与另外位于基态的荧光团发生  $\pi$ - $\pi$  堆积作用，构成激基缔合物，其原有的能量光谱降低或消失，继而生成新的，长波长，宽而强的发射峰。若相互作用的荧光团不在相同识别基团上时，我们称之为分子间激基缔合物；若连接在同一识别基团上，就叫做分子内激基缔合物。设计激基缔合物需同时具备以下两个条件：首先两个荧光团要有大  $\pi$  共轭体系，其次，分子之间发生碰撞的前提条件是其距离要求达到  $3.5 \times 10^{-10}$  m。因此，利用分子间作用力正确调节好荧光团之间的距离是研究基于激基缔合物探针的重中之重。此类荧光探针可以大量的应用于检测磷脂、多肽、核酸等在生物体内环境下的结构和活性。

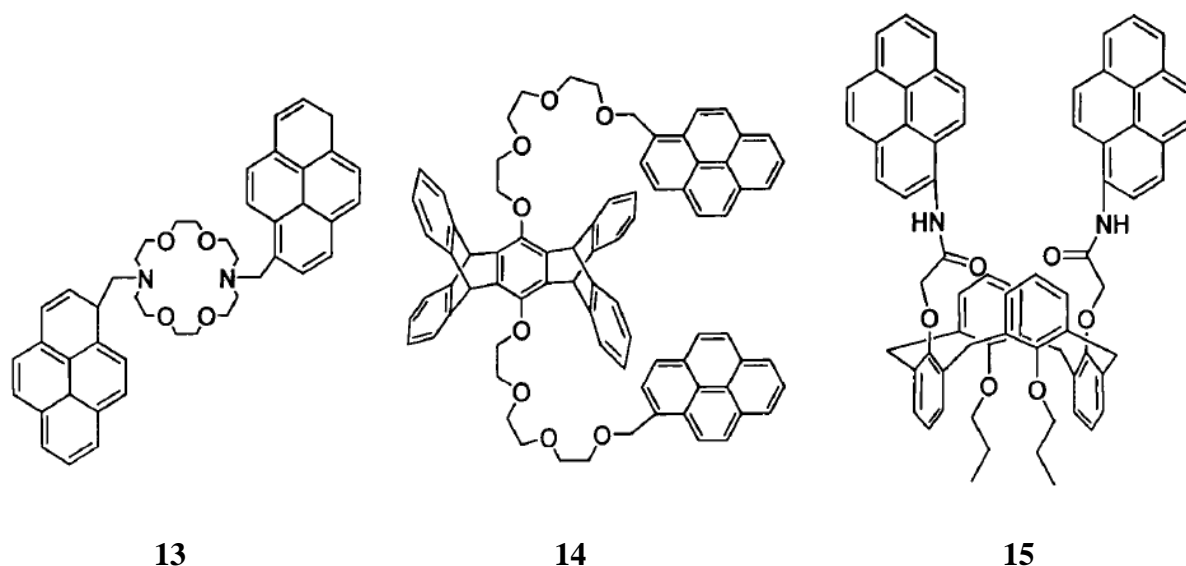


图 1.9 激基缔合物荧光探针

分子探针 13 包含两个芘荧光团<sup>[43]</sup>，当氮杂冠醚与  $K^+$  或  $Ba^{2+}$  等金属阳离子发生络合作用时，荧光强度短时间内急剧增强。分子探针 14 中醚链配位反应后得到类冠醚状结构，芘荧光团结构位置也因此而变化，所以使激基缔合物及单体荧光光谱变化<sup>[7]</sup>。当与  $Ca^{2+}$  和  $Cd^{2+}$  等阳离子发生反应时两端的芘荧光团就会疏远，激基缔合物的荧光强度降低，另一部分荧光强度增强。然而当和二甲铜离子发生反应时两端芘荧光团间生物距离会缩短，其荧光降低，激基缔合物荧光增强，波长蓝移。分子探针 15 是检测氟离子的荧光探针，它第一个借助调控、静态缔合物的方式设计出来的荧光探针<sup>[44]</sup>。乙腈溶液存在前提下里分子探针 15 不但可以产生单体荧光，同时还能产生激基缔合物荧光（428 nm），随着体系中 F 增加，激基缔合物荧

光发生光谱蓝移。

### 1.3.4 荧光共振能量转移 (FRET, fluorescence resonance energy transfer)

荧光共振能量转移 (FRET) 是在不同的荧光团间发生能量转移的过程, 即当 2 个荧光团的间距在一定范围, 且其中一个吸收光谱与另一个发射光谱重叠部分较多且有效, 则就可能通过非辐射过程的能量转移。FRET 过程必须满足以下三个条件: 一, 受体在一定条件下的吸收和给体荧光团的发射交叉部分较多且有效; 二, 适当的排列方式; 三, 相应适当的距离, 给、受体间的间隔越远, FRET 发生的效率就会越低。

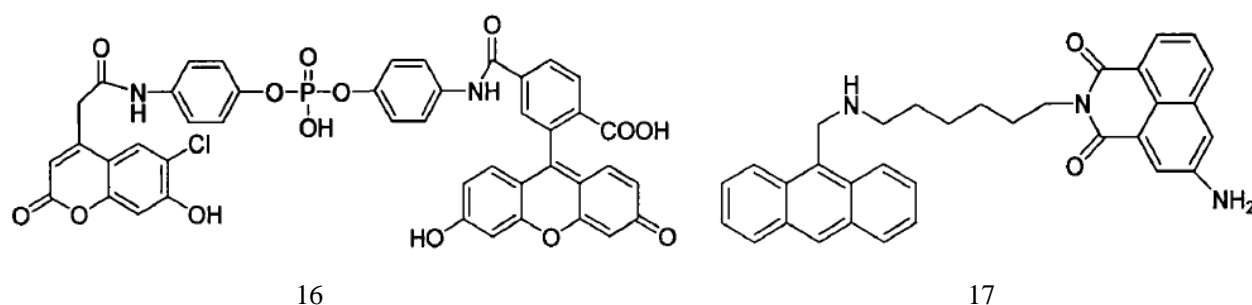


图 1.10 FRET 荧光探针

分子探针 16 是一种检测 PDEs 的分子探针, 含有香豆素与荧光素此两种荧光剂。当香豆素被光激发后, 香豆素与荧光素会发生分子内的 FRET, 发射出荧光素的荧光。当分子中磷酸二酯基团被磷酸二酯酶分解后, 香豆素与荧光素两个荧光团发生分离, FRET 过程被阻断, 此时分子表现为香豆素的荧光。分子探针 17<sup>[45]</sup>由蒽和 C11H7NO 经过与 CH4 连接而成, 两个荧光团间的距离比较远, 故 FRET 效率减少。当用长波照射的时候, 看到分子只在 550 nm 羰基亚胺的发射波长处的荧光。施以短波照射时, 则可看到在 550 nm 和 400-450 nm 处两个发射峰, 随体系中 pH 的上升, 400-450 nm 处蒽的荧光强度急剧下降, 而 C11H7NO 的荧光变化不大。因此, 此探针可被用来检测氢离子的浓度。

### 1.3.5 其他原理

通常荧光分子探针都是根据所述的理论研究设计和制备的, 当然有时也会是灵感巧合所得, 但却有着出其不意的效果。

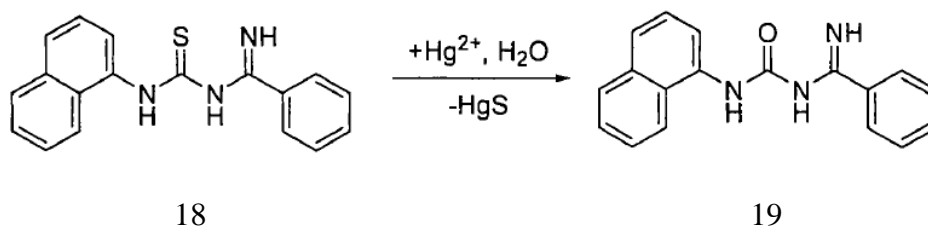


图 1.11 反应性荧光探针

分子探针 18 是一种汞离子分子探针，在溶液里与汞离子结合后其荧光强度增至 34 倍之多，并伴随有光谱红移的现象，经检测发现反应后得到了脱硫化合物 19<sup>[46]</sup>。

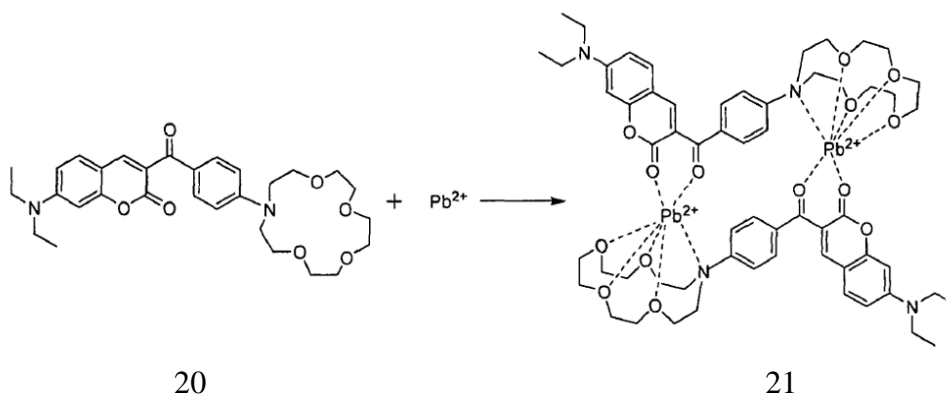


图 1.12 香豆素荧光探针

分子探针 20 对  $Pb^{2+}$  有特异性作用，在乙腈溶液中与  $Pb^{2+}$  作用后，其荧光强度增至 40 倍，光谱红移 15 nm<sup>[47]</sup>。这种现象是由于探针分子与铅离子进行配位时，其 ICT 过程和分子的构象刚性发生改变的原因。

综上所述，目前已报道大量的荧光探针的反应原理和具有代表性的探针分子，不再赘述。灵活运用这些原理，巧妙地设计探针分子，合成出对分析物具有特异性识别的高灵敏荧光探针，是我们对细胞及活体内各种物质进行荧光检测和分析的最基本思想。

## 1.4 荧光探针分类

随着人们对化学传感器研究的深入，越来越多的材料被用来制备荧光化学传感器，如上转换纳米材料、荧光共轭聚合物、半导体材料、碳纳米材料等等。

### 1.4.1 上转换材料

经过上转换能生成颗粒均一、大小能调、分散良好、发光性能优异的纳米材料，其表面常常含有憎水的有机配体，其不容易与生物分子发生偶联反应进行连接，因此，为了开展推进其在生物学上的应用，研究者对其表面进行化学修饰以更好的与生物分子进行连接，如图 1.13 所示<sup>[48]</sup>。下面我们对其中一些方法进行简要的介绍：

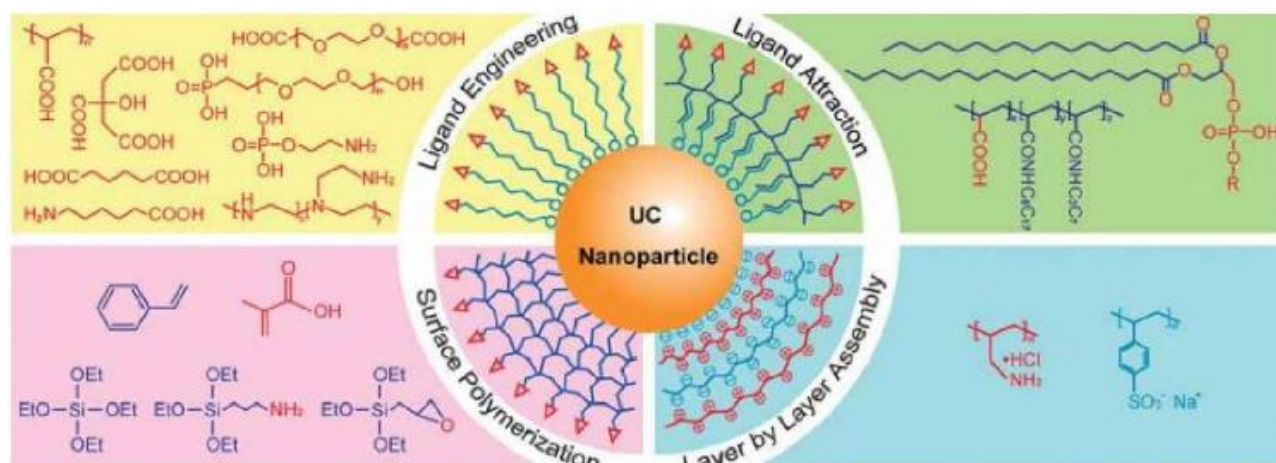


图 1.13 上转换纳米颗粒表面修饰

配体交换法：

Chow 等人<sup>[49]</sup>通过热裂解方法制备了油胺附着的上转换材料，用带有亲水性双羧酸基团的 PEG 与具有疏水性质油胺分子进行配体交换反应后，亲水特性的双羧酸提高了其水溶性，且外围的羧基还可继续与生物体细胞内分子发生偶联。但配体交换法只适用于强配体和弱配体的交换。

表面配体氧化法：

Li 课题组<sup>[50]</sup>研究出一种可将含有碳碳双键的有机配体反应为羧酸的方法。如图 1.14，借助氧化剂勒米厄-冯路德洛夫，把具备 C=C 的油酸配体氧化反应生成羧基。此过程原理可用于含有饱和键表面配体的上转换材料。

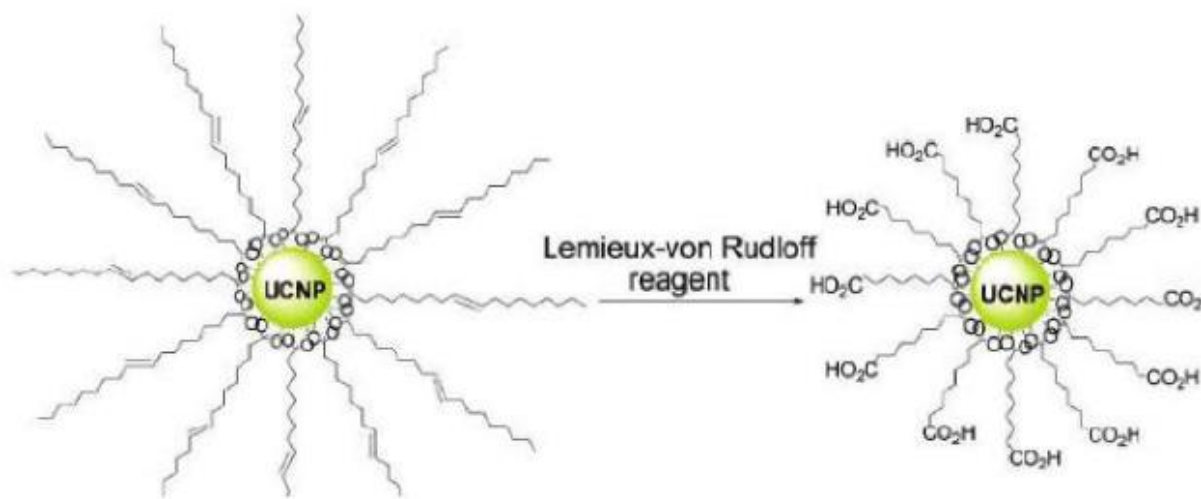


图 1.14 表面氧化法

#### 二氧化硅包裹法:

这种方法是利用硅烷的水解聚合，在上转换纳米材料外面生成一层二氧化硅。Zhang 等人<sup>[51]</sup>运用此原理，在上转换纳米材料外包覆一层二氧化硅，增加上转换的亲水性质，且可吸附多种染料分子，发生能量共振转移。SiO<sub>2</sub> 复合法的应用很普遍，具有亲水性的材料可利用微乳包裹法，疏水性纳米材料则可采用反向包裹法。包裹后的材料都有着相对较好的水溶性、分散性及与很好的生物相容性，应用普遍。

#### 聚合物包裹法:

该方法通常利用两亲性聚合物和聚电解质，用自组装法 (LBL)对纳米颗粒进行包裹。该方法关键在于聚合物的两亲性，聚合物疏水一端可与粒子疏水性的烷基通过范德华作用力发生聚集，亲水性基团附着于粒子外层，所以使得复合材料粒子表现为亲水性。Li 等<sup>[52]</sup>利用电荷之间的静电作用，将带有正电荷的盐酸聚烯丙基胺和带负电的 PSS 辅助静电作用进行层层自组装的方法连接，同时外表面线性聚合物 PAH 上的氨基可进行功能化反应，提高了纳米材料的水溶性和生物相容性。

### 1.4.2 共轭聚合物

共轭聚合物是一种特殊的材料，由于电子离域排列形式使共轭聚合物骨架起着导线的作用，因此它拥有大  $\pi$ - $\pi^*$  共轭分子导线结构，这能够很大程度上使荧光信号强度增强，可实现微量分析。共轭聚合物中存在很多荧光团，他们通过共轭作用被连成一个整体，当分析物与任意一识别基团发生作用时，分子间的共轭作用会使其他荧光团也发生的现象，共轭聚合物的这种特殊的“分子导线效应”使其在不利用荧光团和识别基团下高效地放大了荧光覆盖范

围，对分析物表现为“一点接触、多点响应”的特点（图 1.15）<sup>[53]</sup>，从而实现了分析测物灵敏检测。

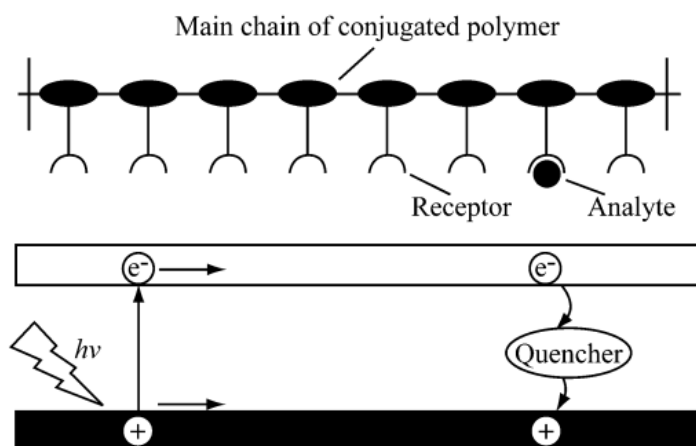


图 1.15 荧光放大原理

池春彦等设计合成了含有苯并噻唑的聚芴（图 1.16）。体系中加入 ss DNA 时，带正电荷的苯并噻唑聚芴会诱导负电荷的蛋白质而发生聚集，使能量从聚芴单元转移到 BT 单元，芴的荧光逐渐减低，BT 的荧光逐渐增加，溶液荧光也随之由蓝色变为绿色。

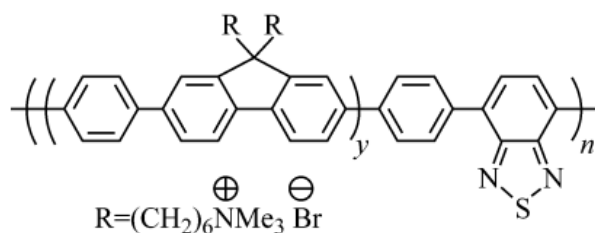


图 1.16 PFBT 结构图

### 1.4.3 半导体量子点材料

半导体纳米粒子是指粒径小于等于电子-空穴半径的量子点，量子点的三维尺寸均小于费米波长，电子-空穴的作用力增加，使得其在三个维度上均受限制，无法自由变动，连续能带也变为分立能级结构，故而量子点有着与多环芳烃相似的光学性质<sup>[54]</sup>。量子点具有表面活化能高、量子隧穿、激子活动受限、表面密度小等特殊性质，相比于其他传统荧光表现为不同的光学性质。

#### (1) 宽而连续的激发谱带

传统荧光染料激发波长窄且要用特定的波长进行激发，因此想要获得不同区域的荧光，就得选用多种荧光染料及其对应的激发光源，过程繁杂。然而用同一激发波长的同时激发

不同的量子点<sup>[55-57]</sup>。量子点的这一性质可被用于对分析物的平行标记，也可同时检测细胞中不同分子的各自动态。

### (2) 窄而对称的发射谱带

发射峰较窄，而且发射峰少有重叠，与发射峰较宽的以往的荧光染料对比，更易区分、识别荧光谱图。这种性质在对分析物的平行标记及检测中非常重要。

### (3) 大的斯托克斯位移

量子点一般都有较大的斯托克斯位移，可克服传统荧光染料由于激发和发射峰之间的高度重叠带来自吸收干扰的缺点，有效地避免激发与发射波谱的重叠，减少实际分析物测定时荧光的相互干扰。

### (4) 长荧光寿命

传统荧光染料的使用时间都不长，通常只有几个纳秒，但量子点与之比较起来荧光的寿命经常都有百十纳秒，量子点较长寿命可有效减少背景荧光的干扰，增强检测的灵敏性。

### (5) 优异的光稳定性

量子点具有优异的光稳定性，长时间的激发光照射，光漂白现象也几乎不会发生。而传统荧光染料在长时间的激发光照射下，荧光发射强度慢慢变小甚至消失，发生光漂白现象，这使量子点拓展至生物及医学等领域更有实际价值。

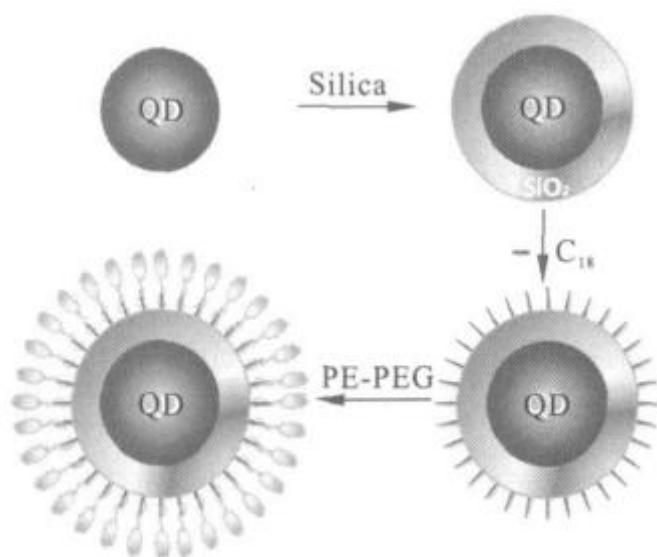


图 1.17 聚合物与 SiO<sub>2</sub> 复合的量子点

Hu 等把亲水性二氧化硅(SiO<sub>2</sub>)包裹在 CdSe/ZnS 量子点上，后用疏水性的十八硅烷再次包裹，再与聚乙烯-聚乙二醇进行组装，就变为了具有多重功能化的核壳结构(图 1.17)，量子点相容性被大大提高。



#### 1.4.4 金纳米颗粒、碳纳米材料

金纳米粒子具有宽泛的可见光吸收波谱，不仅可以和供体能量的发射光谱部分交叉重叠，而且拥有很强的氧化性与淬灭反应，因此备受关注。与之对应的的纳米粒子的淬灭效应使其对生物活性分子灵敏度极高。利用某段寡聚核苷酸偶联剂接上荧光基团，另外一端借助巯基连接金纳米粒子，来分析检测核酸，较之前的核酸信标检测方法灵敏度增强了近 100 倍<sup>[58]</sup>。Chang<sup>[59]</sup>课题组第一次通过水溶性的硫醇-金纳米粒子来检测  $\text{Hg}^{2+}$ ，滴加  $\text{Hg}^{2+}$ ，使得金纳米颗粒聚集并发生荧光淬灭，检测限是 5.0 nmol。

目前，碳纳米材料的研究主要是碳纳米管和碳量子点，两者皆具有很好的生物相容性与光稳定性，在光电纳米材料与纳米医学方面等方面，备受瞩目。

碳纳米管表现出特有的物化性质，红外光照射后温度升高，被用作光热治疗；碳纳米管发射长波长荧光的特性，也被用作生物成像的研究。此外，纳米管经功能化修饰以后还可以被用作药物传输的载体<sup>[60-62]</sup>。Beckingham 和 Weisman 课题组对碳纳米管在果蝇体内的生物相容性和近红外成像进行了研究<sup>[63]</sup> (如图 1.18)，表征结果如图所示，碳纳米管既可以发射红外荧光，又可以与生物体很好的相容，最终生物成像效果良好。

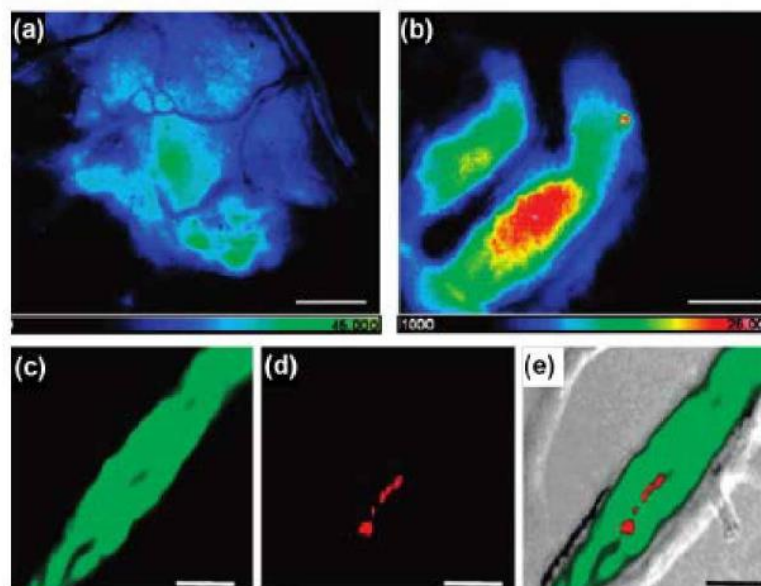


图 1.18 碳管在肠和血液中近红外图像

碳量子点以其优异性能备受科研工作者关注，不仅制备方法简单方便，生物相容性良好，而且没有生物毒性<sup>[64]</sup>。Kang 课题组采用简便方法制备出尺寸不一发射波长不同的碳量子点，结果显示其水溶性好，可以用长波长光束照射，短波长荧光发射，导致反斯托克斯位移。应



用在生物方面，其前景广阔。Sun 课题组尝试把 PEG 修饰到碳量子点的表面，结果可以在淋巴循环中成像<sup>[65]</sup> (如图 1.19)。尽管碳量子点有诸多优势，但也有一部分缺陷，比如，其最大激发波长所处位置不易固定，使得发射峰因激发光的波长的不同而漂移，此外，短波长才能激发碳量子点，干扰其自荧光，如此限制了其相关实际应用。

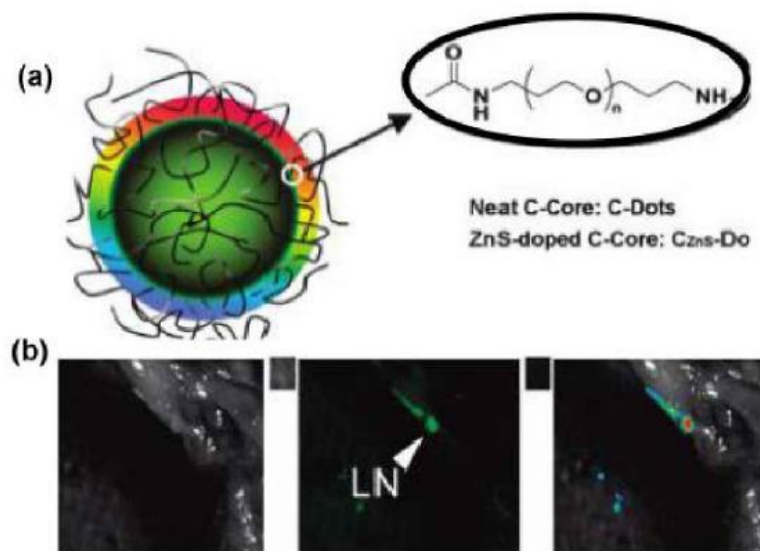


图 1.19 (a)PEG 和 ZnS 修饰的碳量子点示意图

(b)解剖后的腋窝处淋巴结荧光图片

## 1.5 论文研究意义及主要内容

近年来荧光分子探针的研究发展非常迅速，在有机、无机、生物、药物等领域的都有着非凡的成效，各种具有优异性能的探针分子层见迭出，使荧光探针日渐成为科研工作者一种不可或缺的检测方法。

反应型探针就是分子和分析物在一定条件下参与体系的化学反应，因前后分子构造的差异性而发出不同的荧光信号。化学反应型荧光探针发展十分迅速，区别于常见的主要借助一些弱键产生作用的探针，其主要运用探针与分析物参与的化学反应，发生颜色及光谱变化，以进行识别及传感的作用。反应型荧光探针具有更好的选择性是因为其识别过程中探针与分析物之间发生化学反应所形成的稳定化学键。所以，设计合成化学反应型比率探针，无论在传感还是识别方面都具有非常关键的理论和现实意义。

本文的工作是根据荧光分子探针的原理，并联合前人相关的探索经验，以一氧化氮，半胱氨酸和过氧化氢为检测对象，分别选取具有稳定且强荧光的茚基、茈及其衍生物稠环芳烃类化合物为荧光团，研究并且制备了三种新型化学反应型荧光分子探针，拟展开研究内容如下：

(1) 基于苄-邻苯二胺-苄结构的 NO 探针。通过 Suzuki 偶联反应, 实现探针的合成, 并对其结构、光物理性质进行表征确认。结果表明探针对于体外及生物体内的 NO 都有很好的响应。此探针还具有很高的灵敏度和专一性, 与 NO 作用后, 其最大吸收和发射波长均表现明显的红移, 同时强度也有相应变化。通过飞行时间质谱的表征, 验证了荧光探针设计的合理性与可行性。通过分子模拟确认了这一策略的理论可实践性和准确性: 当探针分子遇到一氧化氮后, 芳香邻二氨基与 NO 分子发生分子内环化成三唑结构, 从而使富电子的芳香胺转变成弱给电子特性, 荧光显著增强, 因而能够对 NO 进行识别。

(2) 设计合成了一种反应型半胱氨酸分子探针, 并对其结构及光物理性质进行表征确认。由于氨基的吸电子影响, 该探针几乎没有荧光, 随着半胱氨酸的加入, 探针中的马来酰亚胺与半胱氨酸发生迈克尔加成反应, PET 过程被破坏, 探针分子的荧光明显增高至 134.7 倍。该探针对于半胱氨酸具有高度识别性且不受其他氨基酸的影响, 实现了对半胱氨酸的高度、灵敏选择性的检测。

(3) 以茈萘酰亚胺为荧光团, 硼酸酯为识别基团设计了一种过氧化氢荧光分子探针。但是, 反应合成的产物未能纯化出来, 与设计实验时的预期结果是不相符的。因此, 实验方案有待改进以期获得满意的结果。

## 第二章 基于 PET 过程的一氧化氮反应型荧光探针

一氧化氮 (NO) 是生物体内新陈代谢而产生的自由基, 它参与心血管系统中血压调节, 免疫系统中抗肿瘤活性调节和中枢和外周神经中神经传递分子信号传递等<sup>[66-73]</sup>。例如, 一氧化氮在进行神经传递作用时, 调节消化道, 呼吸道和泌尿生殖道等外周器官平滑肌的舒张; 一氧化氮是最轻、最小、最基础的体内信号分子, 它的生理作用与记忆、摄食、性兴奋、吸收消化、呼吸、泌尿系统等都有着紧密的关联。所以, 对 NO 的检测在疾病预防、诊断与治疗等方面意义重大。

NO 的检测方法包括亚硝酸盐、硝酸盐法、电化学方法<sup>[74-77]</sup>、血红蛋白荧光法、化学发光法<sup>[78]</sup>和基于 NO 荧光分子探针检测法<sup>[79-85]</sup>等。在这些方法中, 荧光法具有高灵敏度、实时直观、简单易行等特点, 一直被视为最方便有效的方法。

迄今为止, 有很多检测 NO 的荧光探针被报道, 这些检测 NO 的荧光探针通常包含以下两类: (1) 基于有机小分子的荧光探针, 以  $C_6H_4(NH_2)_2$  为检测基团, 利用 PET 效应检测细胞内的 NO。(2) 基于过渡金属配合物构成的的荧光探针, 通过取代反应检测 NO。

虽然已发展了许多检测 NO 的荧光探针, 但如何开发新的探针体系, 提高探针的荧光强度、稳定性, 继而提高检测 NO 的灵敏度和选择性, 是科研上亟待解决的重点和难题。

### 2.1 分子设计

首先是荧光母体的选择。芴是联苯结构且具有一定的刚性的化合物。由于内转换在振动耗散过程中几率很低, 芴及芴的衍生物都具有较好的荧光性能。除此之外, 带隙宽、修饰性强、稳定性好等优点使它被广泛的应用于荧光传感和电致发光材料。由于芴上亚甲基受苯环作用, 使得 9 位上的氢性质十分活泼。2 位和 7 位的氢也很活泼, 这就使得芴很容易通过修饰这几个位点, 以达到改变其结构、性质以及波长的目的。同时, 芴还具有双光子特性, 这可用于分析检测及生物成像。综上, 我们将选择有共轭体系的芴作为荧光母体。

其次是识别基团的选择, 由于短半衰期和不稳定的性质, 一氧化氮很难被实时检测。文献报道中, 芳香邻二氨基对一氧化氮有高度选择性及灵敏度, 故常被用于活体或细胞中一氧化氮的研究。这类探针主要有 3,4- 二氨基罗丹明 (DAR) 以及 3,4- 二氨基荧光素 (DAF) 等等。因此, 我课题组把芳香邻二氨基作为特异性识别基团。

本文中选用具有共轭体系的分子芴作为荧光母体, 芳香邻二氨基作为特异性识别基团,

合成了荧光探针 A。探针 A 具有光稳定性好、化学性质稳定、选择性好、灵敏度高、安全方便等优异性能，在中性或弱碱性条件下，探针 A 遇到一氧化氮后，结构发生变化，芳香邻二氨基与 NO 分子发生分子内环化成三唑结构，从而使富电子的芳香胺转变成弱给电子性特性，荧光明显增强，检测结果的灵敏性得到极大的提高。

## 2.2 实验部分

### 2.2.1 试剂与仪器

表 2.1 实验使用的化学试剂

试剂	生产厂家	纯度
无水硫酸钠	国药集团化学试剂有限公司	分析纯
碳酸钾	国药集团化学试剂有限公司	分析纯
氯化钠	西陇化工化学试剂有限公司	分析纯
乙醇	无锡亚盛化学试剂有限公司	分析纯
石油醚	无锡亚盛化学试剂有限公司	分析纯
二氯甲烷	无锡亚盛化学试剂有限公司	分析纯
邻苯二胺	SCR 化学试剂有限公司	分析纯
三乙胺	凌峰化学试剂有限公司	99.5%
四氢呋喃	SCR 化学试剂有限公司	分析纯
丙酮	General-Reagent	分析纯
N-溴代丁二酰亚胺	安耐吉化学试剂有限公司	98.0%
四（三苯基膦）钯	安耐吉化学试剂有限公司	99.0%
三氯甲烷	凌峰化学试剂有限公司	99.0%
N，N-二甲基乙酰胺	阿拉丁化学试剂有限公司	99.8%
乙酸（冰醋酸）	国药集团化学试剂有限公司	99.5%
醋酸钯（II）	安耐吉化学试剂有限公司	99.9+%
Pd(dppf)Cl <sub>2</sub>	STREM 化学试剂有限公司	无
联硼酸频哪醇酯	安耐吉化学试剂有限公司	98%
二甲基亚砷	沃凯化学试剂有限公司	99%
2-溴苄	安耐吉化学试剂有限公司	95%

监控反应过程的薄层层析硅胶板 (TLC)，购自青岛邦凯分离材料有限公司 (涂层厚度: 0.15-0.2 mm, 硅胶粉粒度: (HPTLC):  $8\pm 2\ \mu\text{m}$   $\geq 80\%$ ; (TLC): 10-40  $\mu\text{m}$ , 散射参数: SX=3, PH 值: 6.2-6.8, 型号:HSGF254, 规格: 20×20 cm, 抗检出干扰。利用254 nm和365 nm的紫外光可以观察化合物。用来分离的硅胶粉 (200~300目)购自烟台维启化工产品有限公司。

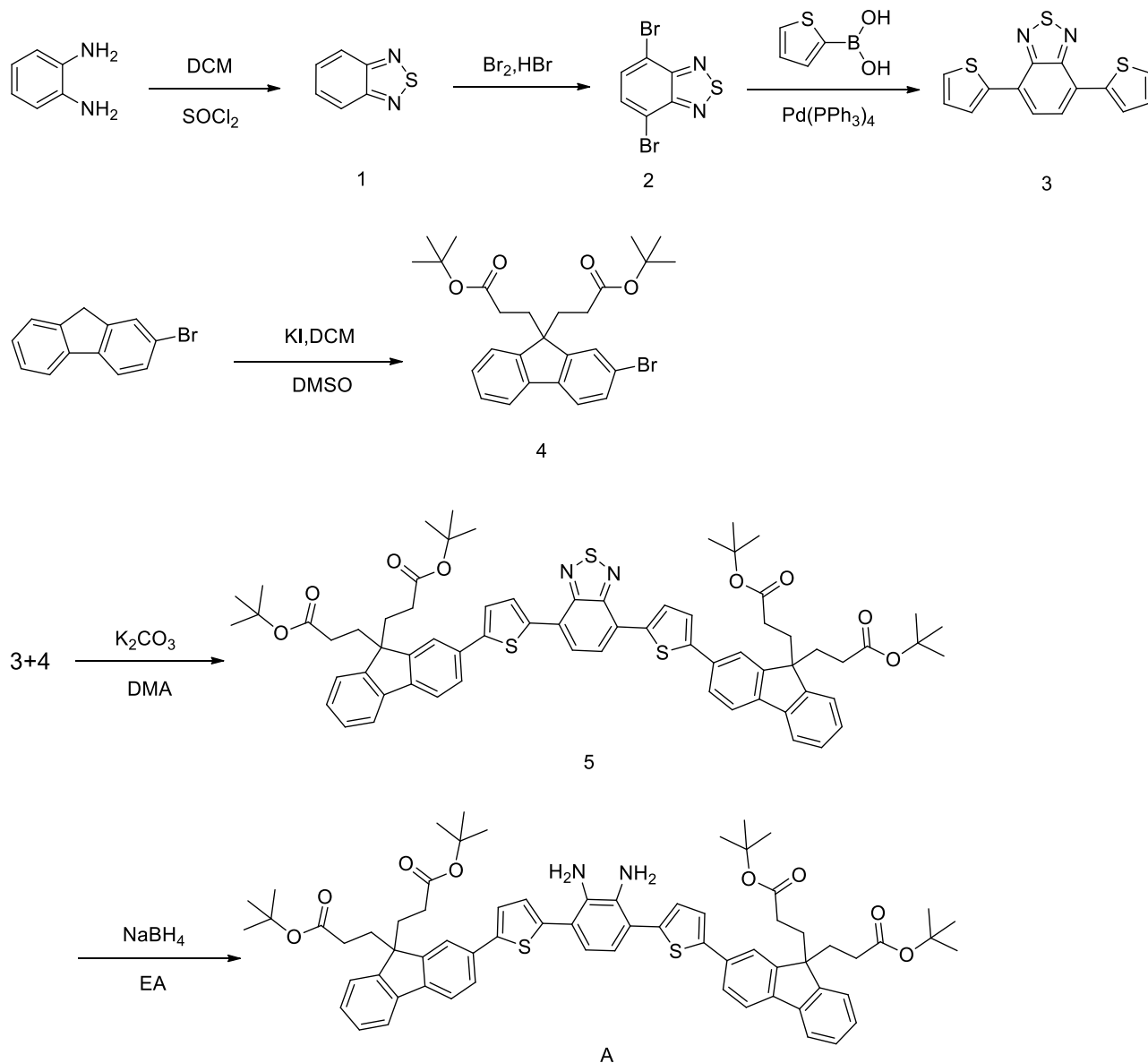
表2.2 使用的主要仪器表

仪器	生产厂家	型号	测试类型
气相色谱-质谱仪	日本岛津公司	GCMS-QP2010 Plus	
气相色谱仪	日本岛津公司	GC-2010	
自动进样器	日本岛津公司	AOC-20i	质谱分析
飞行时间质谱仪	日本岛津公司	MALDI-7090	
紫外-可见-近红外 吸收仪	日本岛津公司	UV-3600	光学分析
荧光分光光度仪	日本岛津公司	RF-530PC	

$^1\text{H}$ NMR 和  $^{13}\text{C}$ NMR 测试使用德国 Bruker 公司 DRX 400型核磁共振光谱仪, 在400 MHz条件下样品溶解于氘代氯仿( $\text{CDCl}_3$ )中; 化学位移以  $\delta$  记录, 以四甲基硅烷(TMS) ( $\delta=0$  ppm) 为标准, 谱图中裂分情况表示如下: s (singlet), d (doublet), t (triplet), 和m (multiplet)。

## 2.2.2 化合物的合成及结构表征

### (1) 合成路线



## (2) 具体实验步骤

### (a) 化合物 1 的合成

两口烧瓶 (500 ml) 中, 将邻苯二胺 (15 g, 138.9 mmol)、三乙胺 (75 ml) 溶于 200 ml 二氯甲烷中。冰水浴  $0^\circ\text{C}$  下, 注射器逐滴滴加二氯亚砷 11 ml, 冷凝回流, 滴加完毕, 转移至油浴锅中,  $40^\circ\text{C}$  下反应过夜。自 温, 二氯甲烷进行萃取, 干燥, 旋干, 产物直接用于下一步。

### (b) 化合物 2 的合成

两口反应瓶 (500 ml) 中, 依次加入干燥的化合物 1、冰醋酸 (70 ml)、氢溴酸 (60 ml)、液溴 (14 ml), 冷凝回流,  $75^\circ\text{C}$  下反应 6 h。冷却至室温, 整体反应液用 1000 ml 抽滤瓶中抽滤, 少量的乙醇或者甲醇对滤饼进行洗涤。抽滤完成后, 乙醇重结晶以除去 TLC 薄层色谱监测检测到的基线杂质。 $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.73 (s, 2H).

## (c) 化合物 3 的合成

两口瓶 (100 mL) 中, 将 4, 7-二溴-2, 1, 3-苯并噻二唑 (2.01 g, 6.84 mmol), 2-噻吩硼酸 (1.42 g, 11 mmol) 溶解在 20 mL 甲苯中, 注入 2 M 碳酸钾溶液 15 mL。抽换氮气三次, 加入四(三苯基膦)钯 (150 mg, 0.14 mmol), 加热至 75°C, 反应过夜。自然冷却至室温, 二氯甲烷萃取, 干燥, 除去溶剂, 柱层析分离得红色晶体 3 1.73 g, 产率 84.3%。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8.12 (dd,  $J$  = 3.7, 1.1 Hz, 2H), 7.88 (s, 2H), 7.46 (dd,  $J$  = 5.1, 1.1 Hz, 2H), 7.24 – 7.20 (m, 2H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  152.61, 139.36, 128.02, 127.51, 126.81, 125.75。

## (d) 化合物 4 的合成

在两口瓶 (250 ml) 中, 将 3-溴丙酸叔丁基 (6.7 g, 32 mmol), 二溴苄 (2.9 g, 12 mmol), 碘化钾 (200 mg, 1.2 mmol) 溶解在 DMSO (100 ml) 和 50% (w/w) NaOH 水溶液 (30 ml) 中。反应混合物在 60°C 应混下搅拌 6 h。二氯甲烷萃取, 干燥, 除去溶剂, 柱层析分离得淡黄色液体 4 5.2 g, 可直接用于下步。

## (e) 化合物 5 的合成

在 100 mL 的 Schlenk 管中, 三甲基乙酸 (33 mg, 0.32 mmol), 碳酸钾 (400 mg, 2.9 mmol), 4, 7-二噻吩-2, 1, 3-苯并噻二唑 (340 mg, 1.13 mmol), 9, 9-双 (3, 3'-二丙酸叔丁酯)-2-溴苄 (1 g, 2 mmol), 溶解在 35 ml 无水 N, N-二甲基乙酰胺中, 抽换氮气三次, 加入醋酸钯 (60 mg, 0.27 mmol), 加热至 105°C, 反应过夜。二氯甲烷萃取, 干燥, 浓缩, 柱层析分离得到红色晶体 TBBT 1.6 g, 产率 70.2%。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8.13 (d,  $J$  = 3.7 Hz, 2H), 8.08 – 8.07 (m, 1H), 7.92 (s, 2H), 7.72 (s, 8H), 7.50 (d,  $J$  = 3.7 Hz, 2H), 7.45 – 7.32 (m, 6H), 2.50 – 2.38 (m, 8H), 1.63 – 1.48 (m, 8H), 1.31 (s, 36H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  172.80, 152.58, 149.04, 148.35, 145.83, 140.98, 140.66, 138.61, 133.52, 128.62, 127.87, 127.68, 125.72, 125.43, 125.30, 124.18, 123.13, 120.50, 120.10, 120.07, 80.19, 34.72, 28.03。

## (f) 化合物 A 的合成

在两口瓶 (100 ml) 中, 将 TBBT (200 mg, 0.4 mmol) 溶解在乙酸乙酯 (10 ml) 和甲醇 (3 ml) 混合物中, 慢慢加入硼氢化钠 (10 mg, 0.26 mmol), 反应混合物在 0°C 下搅拌 2h。二氯甲烷萃取, 干燥, 浓缩, 柱层析得黄色晶体 A 113.5 mg, 产率 60.2%。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.73 – 7.68 (m, 4H), 7.64 (dd,  $J$  = 9.7, 1.6 Hz, 4H), 7.44 (d,  $J$  = 3.6 Hz, 2H), 7.42 – 7.31 (m, 6H), 7.24 (d,  $J$  = 3.7 Hz, 2H), 7.02 (s, 2H), 2.39 (t,  $J$  = 8.3 Hz, 8H), 1.52 (dd,  $J$  = 18.4, 8.5 Hz, 8H), 1.30 (s, 36H)。

### 2.2.3 探针分子性能测试

#### (1) 探针分子的配制和使用

将探针 A 溶解在乙醇中，配制为标准溶液，浓度为  $1.0 \times 10^{-4} \text{M}$ 。

NO 饱和溶液根据文献制作而成。在 PBS 混合缓冲溶液 ( $\text{pH}=7.04$ ) 中加入分子探针 A 与不同量的 NO 饱和储备液 ( $v/v=0\sim 1$ )。

在对 NO 进行滴定测试实验时，移取 0.5 ml 探针标准溶液和不同量的 NO 饱和储备液 ( $v/v=0\sim 1$ ) 于写有不同标号的相同 2.0 ml 试剂瓶中，用 PBS 缓冲溶液进行稀释滴定到所需浓度，探针 A 的最终浓度为  $2.94 \times 10^{-6} \text{M}$ 。将试剂瓶中的缓冲体系于室温下搅拌 2 h 后，将一系列平行样转移到石英池中进行吸收光谱和发射光谱的测定。

#### (2) 细胞培养与细胞成像实验

选取 A549 细胞做为研究对象，用 DMEM 培养液进行培养，其中培养液含有 10% 的胎牛血清(FBS)、1%的双抗(链霉素  $50 \mu\text{g/mL}$ ，青霉素  $50 \mu\text{g/mL}$ )，将细胞置于  $37^\circ\text{C}$ ，5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养，当细胞长满时(密度达 80% - 90%，约为  $1 \times 10^6$  个细胞/mL)，将细胞传代到粘有无菌盖玻片的共聚焦皿中后继续培养 24 h。

成像前，将孵育过的细胞均用 PBS 缓冲液 ( $\text{pH}=7.4$ , 0.01 M) 冲洗 2-3 次。成像实验时，用 Leica 激光共聚焦显微镜 ( $\times 40$  倍物镜) 拍摄细胞的荧光照片和明场图像。

## 2.3 结果与讨论

### 2.3.1 可行性验证

为了证实目标化合物的可行性，考察了探针 A 与 NO 作用后的反应液的飞行时间质谱及吸收光谱变化。

如图 2.1 所示，当等当量的 NO 加入浓度为  $2.94 \times 10^{-6} \text{M}$  探针 A 的溶液中搅拌反应 30 min 后，观测到溶液颜色由无色变为黄色，肉眼可方便分辨出来，可作为检测 NO 的直观探针，探针 A 对 NO 响应并在 423 nm 处出现新的强吸收峰。且 NO 使探针 A 在 423 nm 处的吸光度的强度升高了 4.8 倍。

除此之外，我们还检测了反应液的飞行时间质谱来对实验产物进行分析。如图 2.2 所示， $[\text{M}^+(\text{m/z})]:1124$ 。此分析结果验证了我们的猜想，确定了我们分子探针的可行性。



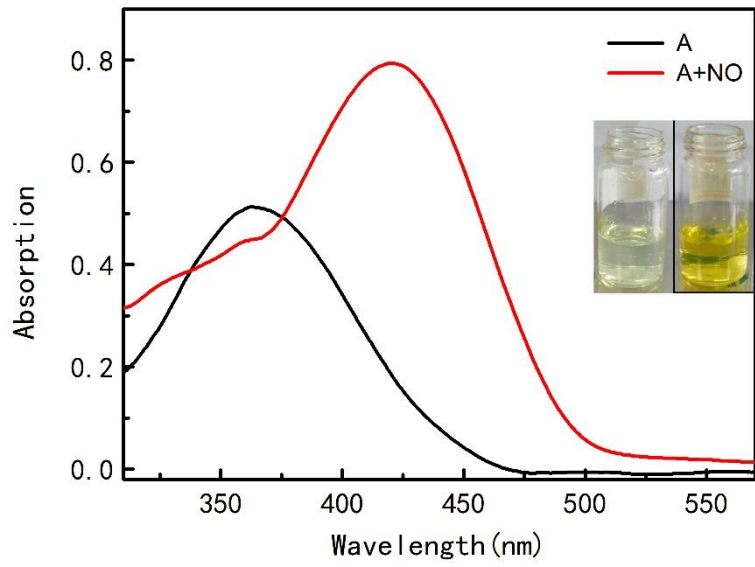


图 2.1 探针 A 加入 NO 前后吸收光谱的变化。  
插图：探针 A 加入 NO 前后颜色变化。

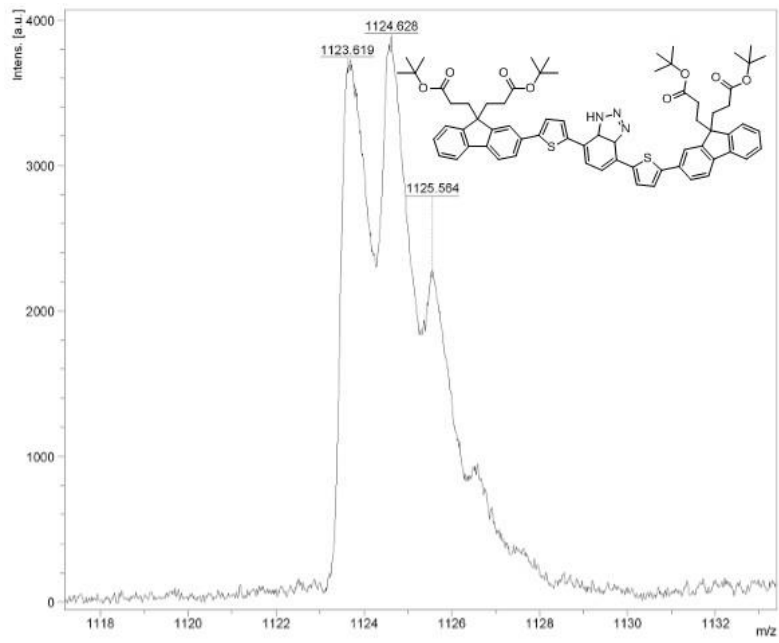


图 2.2 探针 A 与 NO 作用后溶液的 MOLDI-TOF 图

2.3.2 NO 对探针 A 吸收和荧光光谱的影响

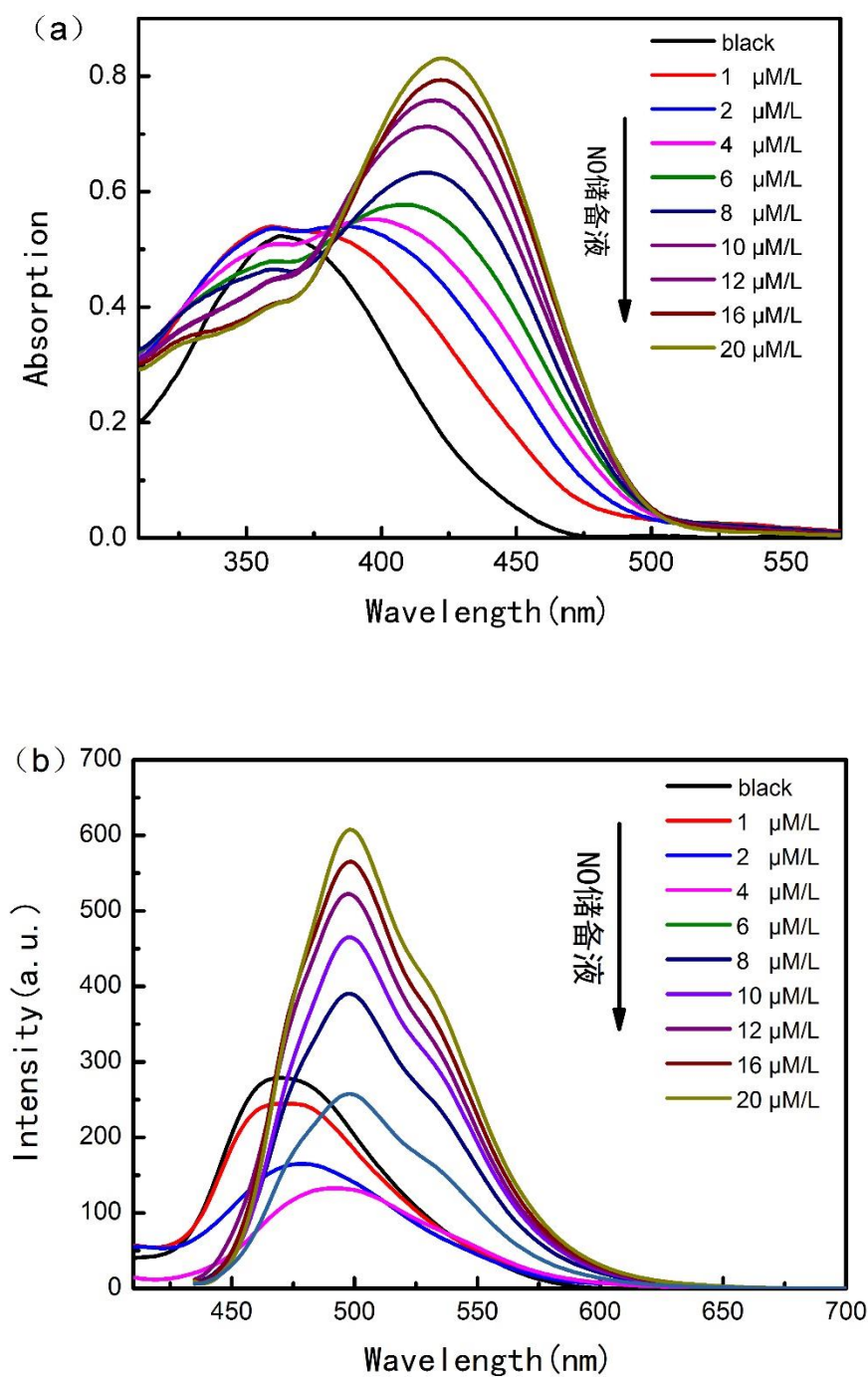


图 2.3 (a) 探针 A( $2.94 \times 10^{-6}$  M)在乙醇-PBS 缓冲溶液(20 mM, pH 7.0, 1:9, v/v) 与不同量的 NO 饱和储备液 ( $n/n = 0 \sim 1$ ) 浓度下的吸收光谱。

(b) 探针 A( $2.94 \times 10^{-6}$  M)在乙醇-PBS 缓冲溶液(20 mM, pH 7.0, 1:9, v/v) 与不同量的 NO 饱和储备液 ( $n/n = 0 \sim 1$ ) 浓度下的荧光光谱。

探针 A ( $2.94 \times 10^{-6}$  M) 溶解在乙醇-PBS 缓冲溶液(20 mM, pH 7.0, 1:9, v/v)中, 作为以

下分析实验的测试体系。图 2.3 (a) 是探针 A 对 NO 滴定测试的吸收光谱图, 我们发现随着 NO 加入量的增加, 探针 A 原先位于 358 nm 处的吸收峰降低, 423 nm 处出现了一个新的吸收峰, 且强度也随 NO 加入量的增加逐渐增加, 波长红移了 65 nm。说明随着溶液中的 NO 含量的增多, 由于发生化学反应而生成的三唑的量也在不断增加, 所以它特有的吸收强度也随着增强。实验现象说明溶液中的 NO 含量浓度与吸收强度有良好的相关性, 实验发现  $n(\text{NO})$  与  $n(\text{A})$  为 1: 1 时即反应完全, 而非文献中的 1: 3, 如图 2.4 所示。溶液中吸收强度随着 NO 浓度的增加也随之快速增加。当 NO 浓度增加到  $n:n=0.8:1$  后, 吸收强度随 NO 浓度增加而增强的趋势逐渐平缓, 并呈现出了一定的线性关系。

图 2.3(b) 是探针 A 对 NO 荧光光谱的响应变化图。在加入 NO 前, 探针 A ( $2.94 \times 10^{-6} \text{M}$ ) 在乙醇-PBS 缓冲溶液 (20 mM, pH 7.0, 1:9, v/v) 中有位于 470 nm 的最大发射峰, 当 NO 储备液含量逐渐增加到当量时, 荧光光谱在 497 nm 处出现新的发射峰且荧光强度有很大的提高。

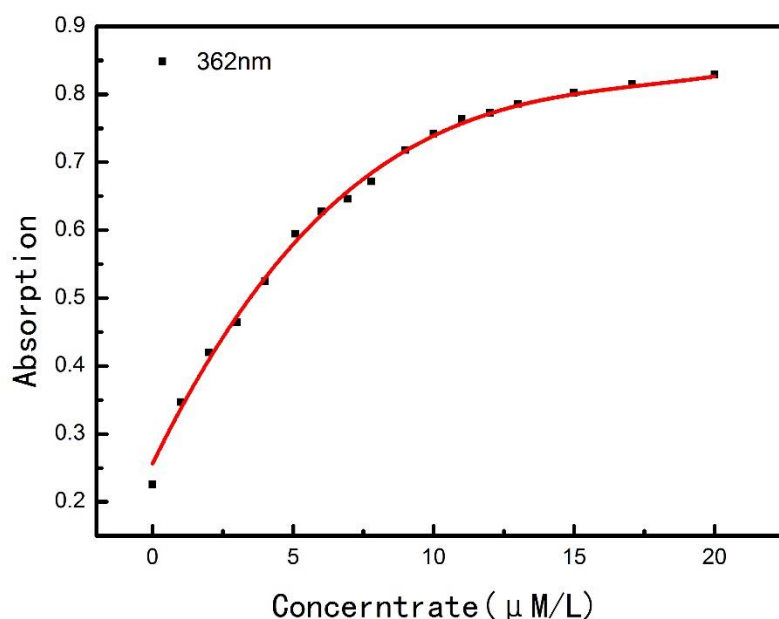


图 2.4 探针 A 对不同浓度的 NO 的线性拟合曲线

### 2.3.3 探针 A 检测细胞内 NO 的荧光成像实验

为了进一步探究探针 A 在生物中的应用, 我们进行了 A549 细胞内一氧化氮的荧光共聚焦显微成像研究 (图 2.5 所示)。我们进行四组实验, Ips 加入细胞共培养以刺激细胞产生一氧化氮, 第三组用血红蛋白与细胞共培养以消耗掉细胞中的一氧化氮, 第四组为空白对照组,

四组平行细胞经过相同的孵育条件后进行共聚焦成像。探针 A 直接与细胞孵育，观察到细胞显示为蓝色荧光（图 2.5 B）。探针 A 在用 lps 处理过的细胞中孵育 20 分钟后可看到细胞中有明显的黄绿色荧光出现（图 2.5 D）。为了进一步证明探针 A 在细胞实验中对一氧化氮的选择性，第三组实验中，用血红蛋白消耗掉细胞内一氧化氮，可以观察到细胞内为蓝色荧光，对比第一组可解释为探针本身的荧光（图 2.5 F）。由此可见，实验表明探针 A 可以很好的应用于细胞内一氧化氮的荧光成像研究。

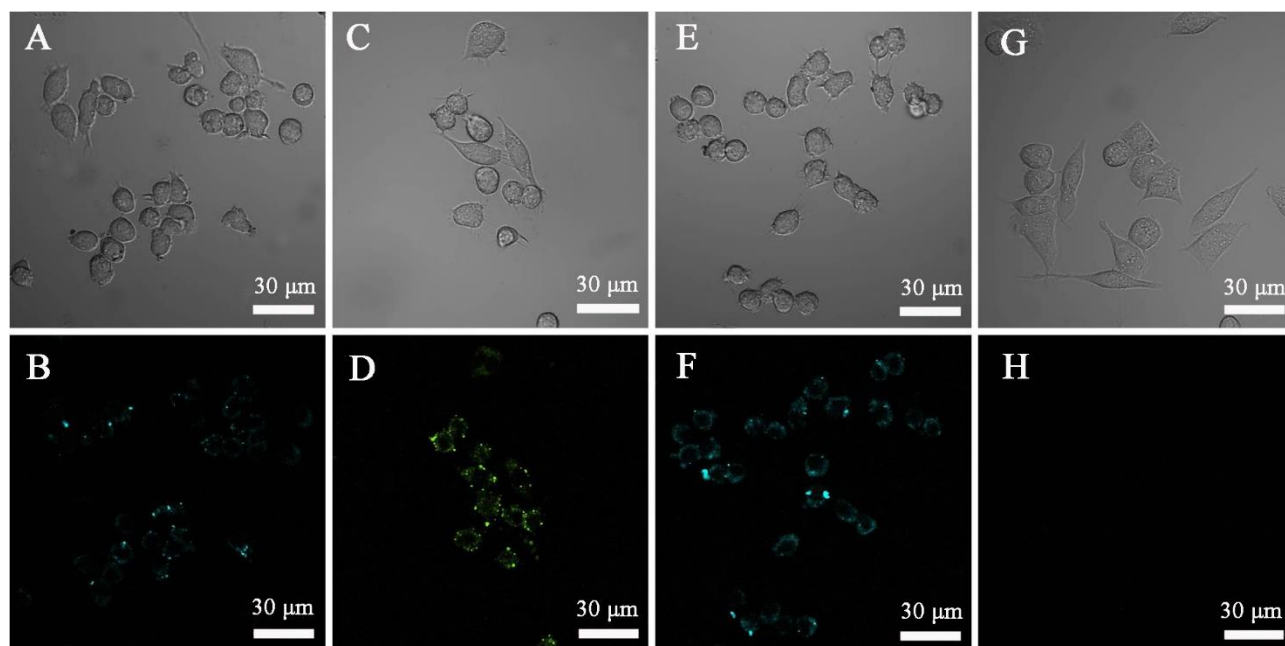


图 2.5 探针 A 在细胞中的共聚焦显微成像

- 1) AB 为细胞加入探针 A 共同孵育后成像图片。
- 2) CD 为细胞先经 lps 处理后，加入探针 A 共同孵育后成像图片
- 3) EF 为细胞先经 lps 处理后，再经血红蛋白处理，加入探针 A 共同孵育后成像图片
- 4) GH 为未处理细胞
- 5) ACEG 为细胞明场图片，BDFH 为细胞荧光图片

## 2.4 本章小结

设计合成了具有大共轭体系对 NO 进行特异性识别的探针 A，通过核磁、质谱等分析方法对中间分子和目标分子探针进行了结构表征。探针对于体外及生物体内的一氧化氮都有很好的响应。此探针还具有很高的灵敏度和专一性，在荧光光谱和吸收光谱上分别表现出了明显的红移。通过对检测液的飞行时间质谱进行表征，验证了我们对于分子探针设计的合理与可行性。当探针分子遇到一氧化氮后，芳香邻二氨基与 NO 分子发生分子内环化成三唑结构，分子内 PET 过程被阻断，从而使富电子的芳香胺转变成弱给电子性特性，荧光强度显著增强，因此对 NO 能够进行特异性识别。

## 第三章 基于 PET 过程的半胱氨酸反应型荧光探针

半胱氨酸 (Cys) 是细胞和组织的生命系统中生长所需的最基本的生物学分子, 在维持生物系统中发挥着重要作用<sup>[86-87]</sup>。半胱氨酸 (Cys) 参与许多细胞功能, 包括维持细胞内的氧化还原活性, 异生素的代谢, 细胞内的信号转导和基因调控等<sup>[88]</sup>。缺乏或过量的半胱氨酸都会导致各种健康问题, 当体内的半胱氨酸 (Cys) 缺乏时会诱发生长迟缓, 水肿, 毛发色素脱失, 嗜睡, 肝功能损害, 肌肉和脂肪的损失, 和皮肤损伤等<sup>[89]</sup>, 同样, 当体内的半胱氨酸 (Cys) 浓度过高时则会诱发阿尔茨海默氏病<sup>[90]</sup>, 心脑血管疾病<sup>[91]</sup>, 神经管缺陷, 炎性肠疾病, 骨质疏松等<sup>[92]</sup>。因此, 实时定量检测和识别生物样品中半胱氨酸 (Cys) 的含量水平在生化、临床医学等领域有非常重要的意义。

现有的半胱氨酸检测方法主要有: HPLC 法<sup>[93]</sup>, 毛细管电泳法<sup>[94]</sup>, 紫外-可见检测/比色测定<sup>[95-101]</sup>、共振散射光谱法等。然而这些方法由于操作复杂、成本高、对细胞内目标分子实时监测的局限性, 仅有少数方法可以应用于细胞检测。荧光检测因其操作简单, 灵敏度高, 高效性、实时原位响应等优点<sup>[102-105]</sup>, 并且通过借助共聚焦检测技术可实现对活体组织甚至于单个细胞进行实时成像, 鉴于以上的优势, 近几年基于不同的机制的各种半胱氨酸荧光探针被广泛研究且发展迅速<sup>[106-110]</sup>, 主要包括 1, 2-迈克尔加成反应<sup>[111-113]</sup>、断裂磺酰胺键反应<sup>[114-115]</sup>、醛基的成环反应<sup>[116]</sup>、金属配合物取代配位反应<sup>[117]</sup>、断裂二硫键反应等以及其它一些机理反应。

以上所述分子探针的研究大大的丰富了半胱氨酸探针的理论研究及生产应用。然而具有溶解性好、灵敏度高、响应迅速和良好的生物相容性等优异特性的半胱氨酸探针受到相关领域的高度关注, 设计和合成对具有这些优异特性的探针是一项对理论探究和实际应用都十分紧迫且重要的工作。

### 3.1 分子设计

花是由五个苯环稠合而成的。由于其大共轭  $\pi$  体系以及平面度, 使其具有量子产率高、带隙宽和热和光化学稳定性等优异的性能。不仅如此, 花及其衍生物的结构也易于修饰, 一是利用花环的海湾位置的化学活性部位, 二是利用花的酸酐及酰胺衍生物, 可以方便的引入各种功能性的官能团, 使得大量具有新奇结构功能的花类化合物得以被设计和开发。在太阳能电池、有机纳米材料、医药光敏剂、生物标记、药物载体和荧光成像等领域有着广泛的应用。最近, 越来越多的探究一直致力于花化合物其他可能的应用, 研究已扩展到许多领域,

尤其是对生物医学的研究已经成为一个日益活跃的新兴领域，并引起了高度的关注。

基于以上所述，我们的工作中选择茈系衍生物作为荧光团，合成了含有茈荧光团和马来酰亚胺基团结合的新的 Cys 反应性荧光探针。这是由于马来酰亚胺中不饱和双键吸电子的作用，会与荧光团发生了 PET 过程，使得荧光母体荧光非常弱甚至于没有荧光，当与 Cys 发生 Michael 加成反应后，PET 过程被破坏，荧光母体荧光恢复，荧光强度增强。

设计并通过硝化、还原和取代三步得到了我们的目标分子探针，用于体外及细胞内生物样品中半胱氨酸的检测。实验结果表明，该探针与 Cys 进行特异性反应后，使得荧光强度比原来的增加 100 多倍。其结果对进一步开发新型化学传感器有着十分重要的生物学意义。

## 3.2 实验部分

### 3.2.1 试剂与仪器

表 3.1 实验使用的化学试剂

试剂	生产厂家	纯度
无水硫酸钠	国药集团化学试剂有限公司	分析纯
氯化钠	国药集团化学试剂有限公司	分析纯
碳酸钠	国药集团化学试剂有限公司	分析纯
甲醇	无锡亚盛化工有限公司	分析纯
石油醚	无锡亚盛化工有限公司	分析纯
二氯甲烷	无锡亚盛化工有限公司	分析纯
乙酸乙酯	无锡亚盛化工有限公司	分析纯
水合肼	国药集团化学试剂有限公司	分析纯
四氢呋喃	国药集团化学试剂有限公司	分析纯
1, 4-二氧六环	国药集团化学试剂有限公司	分析纯
茈	安耐吉化学试剂有限公司	99.0%
三氯甲烷	国药集团化学试剂有限公司	分析纯
硝酸	阿拉丁化学试剂有限公司	65%
顺丁烯二酸酐	阿拉丁化学试剂有限公司	99.0%
乙酸（冰醋酸）	国药集团化学试剂有限公司	99.5%

监控反应过程的薄层层析硅胶板 (TLC), 购自青岛邦凯分离材料有限公司 (涂层厚度: 0.15-0.2 mm, 硅胶粉粒度: (HPTLC):  $8 \pm 2 \mu\text{m} \geq 80\%$ ; (TLC): 10-40  $\mu\text{m}$ , 散射参数: SX=3, PH 值: 6.2-6.8, 型号:HSGF254, 规格: 20×20 cm, 抗检出干扰。利用254 nm和365 nm的紫外光可以观察化合物。用来分离的硅胶粉 (200~300目)购自烟台维启化工产品有限公司。

表3.2 使用的主要仪器表

仪器	生产厂家	型号	测试类型
气相色谱-质谱仪	日本岛津公司	GCMS-QP2010 Plus	质谱分析
气相色谱仪	日本岛津公司	GC-2010	
自动进样器	日本岛津公司	AOC-20i	
飞行时间质谱仪	日本岛津公司	MALDI-7090	
紫外-可见-近红外 吸收仪	日本岛津公司	UV-3600	光学分析
荧光分光光度仪	日本岛津公司	RF-530PC	

$^1\text{H}$ NMR 和  $^{13}\text{C}$ NMR 测试使用德国 Bruker 公司 DRX 400型核磁共振光谱仪, 在400 MHz条件下样品溶解于氘代氯仿 ( $\text{CDCl}_3$ ) 中; 化学位移以  $\delta$  记录, 以四甲基硅烷(TMS) ( $\delta=0$  ppm) 为标准, 谱图中裂分情况表示如下: s (singlet), d (doublet), t (triplet), 和m (multiplet)。

### 3.2.2 化合物的合成及结构表征

#### (1) 合成路线

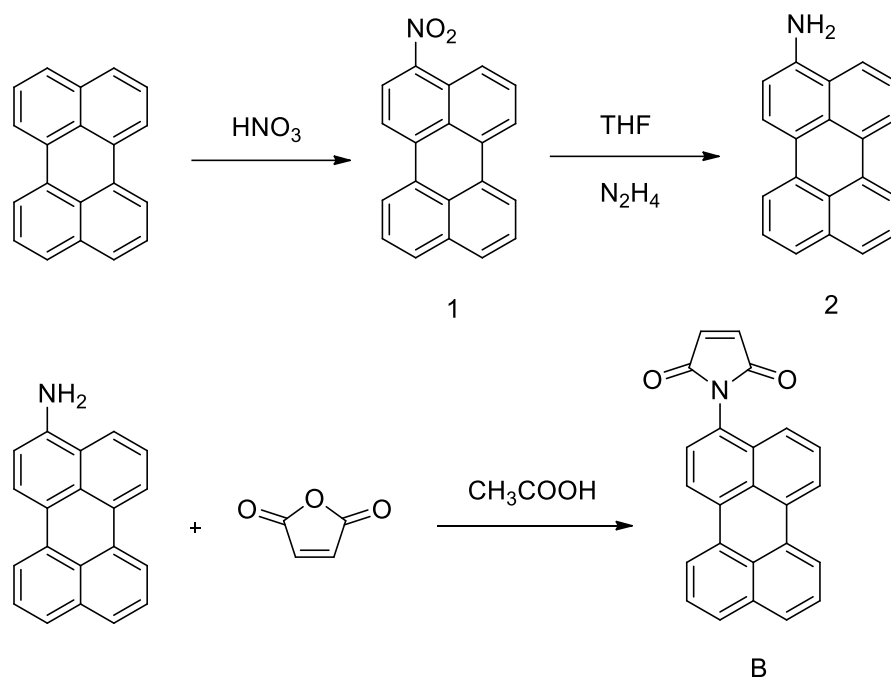


图 3.1 荧光探针 B 的合成路线

## (2) 具体实验步骤

### (a) 化合物 1 的合成

在两口瓶 (250 ml) 中, 将芘 (3 g, 11.9 mmol) 溶解在 1, 4-二氧六环 (100 ml) 中, 用注射器将混匀的  $\text{H}_2\text{O}$  (2 ml) 和浓硝酸 (1.5 ml) 混合溶液缓慢滴加入反应瓶。反应混合物在  $100^\circ\text{C}$  下搅拌 20 min。加入大量水进行淬灭并搅拌片刻, 静置, 熟化, 抽滤, 得到暗红色固体 1, 直接用于下步。

### (b) 化合物 2 的合成

在两口瓶 (250 ml) 中, 将上述过程得到的化合物 1 溶解在四氢呋喃 (100 ml), 甲醇 (30 ml), 水合肼 (50 ml) 中。反应混合物在  $70^\circ\text{C}$  下回流搅拌 4 h。加入大量水搅拌片刻, 静置, 熟化, 抽滤, 得到暗红色固体 2, 柱层析分离除去大极性化合物得到粗产品, 直接用于下步。

### (c) 目标分子探针 B 的合成

在两口瓶 (250 ml) 中, 将化合物 2 (267 mg, 1 mmol), 马来酸酐 (98 mg, 1 mmol) 溶解在冰乙酸 (10 ml) 中。反应混合物在  $120^\circ\text{C}$  下回流搅拌 5 h。待反应瓶冷却至室温, 加入碳酸钠洗至中性, 静置, 抽滤除去大量的无机相, 滤液利用二氯甲烷进行萃取, 干燥, 浓缩, 柱层析得黄色固体即分子探针 B 305.1 mg, 产率 85.2%。



$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.16 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2H), 7.79 – 7.73 (m, 2H), 7.68 (dd,  $J = 14.5$ , 8.1 Hz, 3H), 7.51 (dt,  $J = 17.3$ , 7.8 Hz, 2H), 7.28 (dd,  $J = 14.2$ , 6.3 Hz, 1H), 7.20 (d,  $J = 8.6$  Hz, 1H), 6.93 (s, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  169.86, 134.91, 134.37, 134.35, 131.70, 130.55, 130.03, 129.82, 129.37, 129.18, 128.78, 128.58, 128.40, 128.15, 127.55, 127.35, 126.58, 126.27, 124.75, 123.22, 121.37, 120.87.

### 3.2.3 探针分子性能测试

#### (1) 探针分子的配制和使用

探针 B 溶解在二甲亚砜中，配制为标准溶液，其中浓度为  $2.0 \times 10^{-5} \text{M}$ 。

在 HEPES 混合缓冲溶液中加入分子探针 B 与不同浓度的 Cys。

在对 Cys 进行滴定与选择性实验时，移取 5 ml 探针标准溶液和不同浓度的 Cys 于 10 ml 试剂瓶中，用 HEPES 缓冲溶液稀释滴定至所需的浓度，最终得探针 B 的浓度为  $1.0 \times 10^{-6} \text{M}$ 。将试剂瓶中的缓冲体系于室温下稍加搅拌后，将一系列平等样转移到石英池中进行紫外吸收光谱和荧光发射光谱的测定。

#### (2) 细胞培养与细胞成像实验

选取 HeLa 细胞做为研究对象，用 DMEM 培养液进行培养，其中培养液含有 10% 的胎牛血清 (FBS)、1% 的双抗 (链霉素  $50 \mu\text{g/mL}$ ，青霉素  $50 \mu\text{g/mL}$ )，将细胞置于  $37^\circ\text{C}$ ，5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养，当细胞长满时 (密度达 80% - 90%，约为  $1 \times 10^6$  个细胞/mL)，将细胞传代到粘有无菌盖玻片的共聚焦皿中后继续培养 24 h。

成像前，将孵育过的细胞用 PBS 缓冲液 ( $\text{pH} = 7.4$ , 0.01 M) 冲洗 2-3 次。成像实验时，用 Leica 激光共聚焦显微镜 ( $\times 40$  倍物镜) 拍摄细胞的荧光显微照片和 BF 明场图像。

## 3.3 结果与讨论

### 3.3.1 含 Cys 化合物对探针 B 吸收和荧光光谱的影响

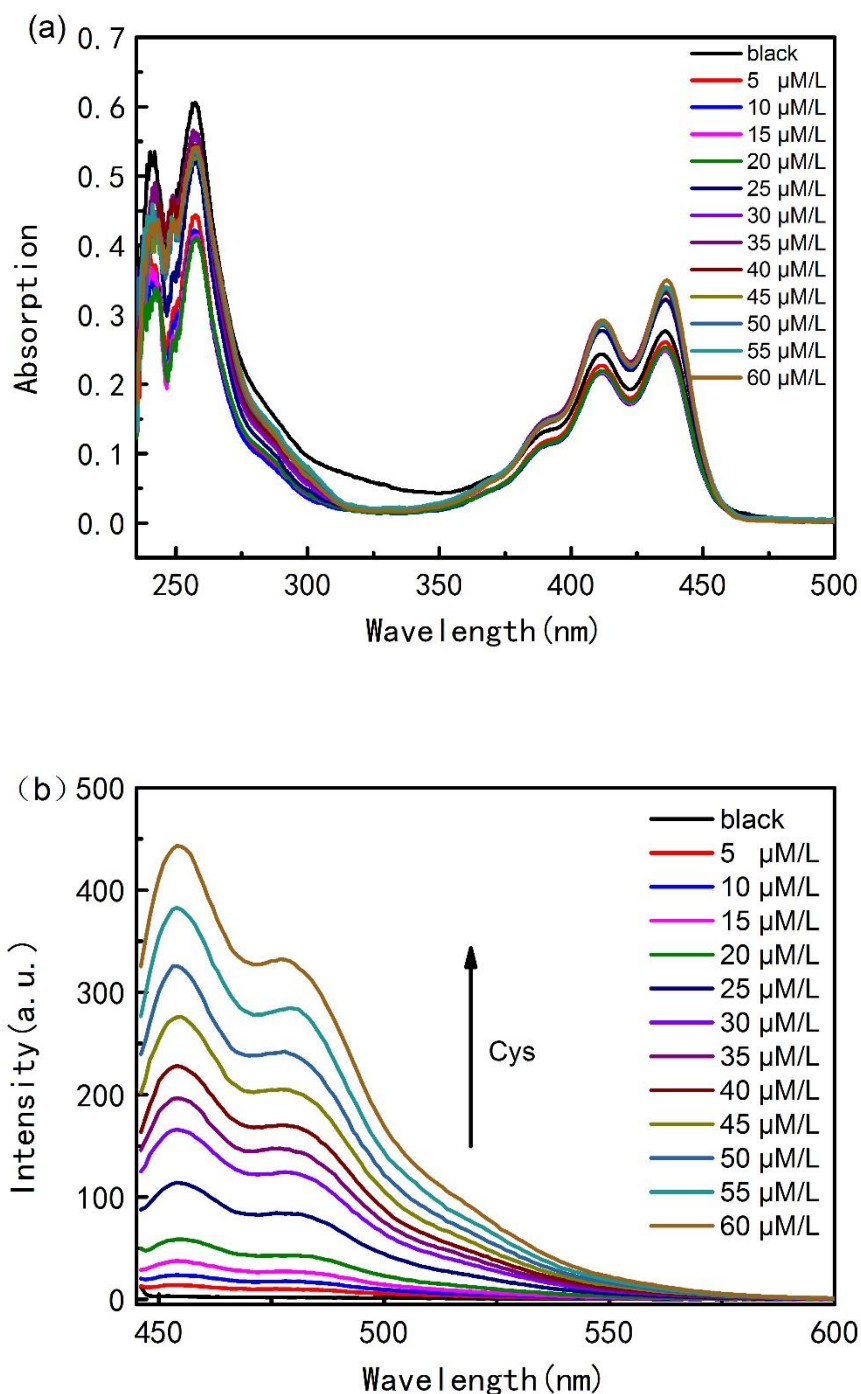


图 3.2 (a) 探针 B ( $1.0 \times 10^{-5}$  M) 在二甲亚砜-HEPES 缓冲溶液(pH 7.04, 1:2, v/v)与不同量的半胱氨酸盐酸盐浓度下的吸收光谱。

(b) 探针 B ( $1.0 \times 10^{-5}$  M) 在二甲亚砜-HEPES 缓冲溶液(pH 7.04, 1:2, v/v)与不同量的半胱氨酸盐酸盐浓度下的荧光光谱。

探针 B ( $1.0 \times 10^{-5}$  M) 溶解在二甲亚砜-HEPES 缓冲溶液(pH 7.04, 1:2, v/v)中, 作为以下分析实验的测试体系。图 3.2 (a) 是探针 B 对 Cys 滴定测试的吸收光谱图, 我们发现体系

中随着 Cys 量的增加,探针 B 原先位于 236 nm 和 263 nm 处的吸收峰出现一个降低的现象,在 411 nm 和 477 nm 处则出现吸收峰增强的现象。说明随着溶液中的 Cys 含量的增加,由于化学反应而生成的新的结构也在持续增加,所以它原有的吸收强度也随之发生改变。

在其他实验条件不变的情况下,考察了反应体系中随着 Cys 浓度的变化对荧光强度的影响,如图 3.2b 为探针 B 在不同浓度的 Cys 存在下的荧光光谱图。在未加入半胱氨酸盐酸盐溶液的时候,可看出探针 B 是几乎没有荧光的。当体系中加入不同浓度的 Cys 溶液时,在 454 nm 处出现增强的荧光发射峰,并随着半胱氨酸盐酸盐的浓度增加荧光强度表现为逐渐增强的趋势。当体系中 Cys 浓度为分子探针的 0.5 个当量时,荧光强度相比原来的增加了 134.7 倍。当我们加入更多量的 Cys,探针 B 的荧光强度不会再增加。以上实验现象表明体系中 Cys 的存在,能够与探针 B 发生迈克加成反应, PET 过程被破坏,恢复荧光母体的荧光,荧光强度增强,实现对 Cys 的定量检测。

### 3.3.2 探针 B 的特异性选择

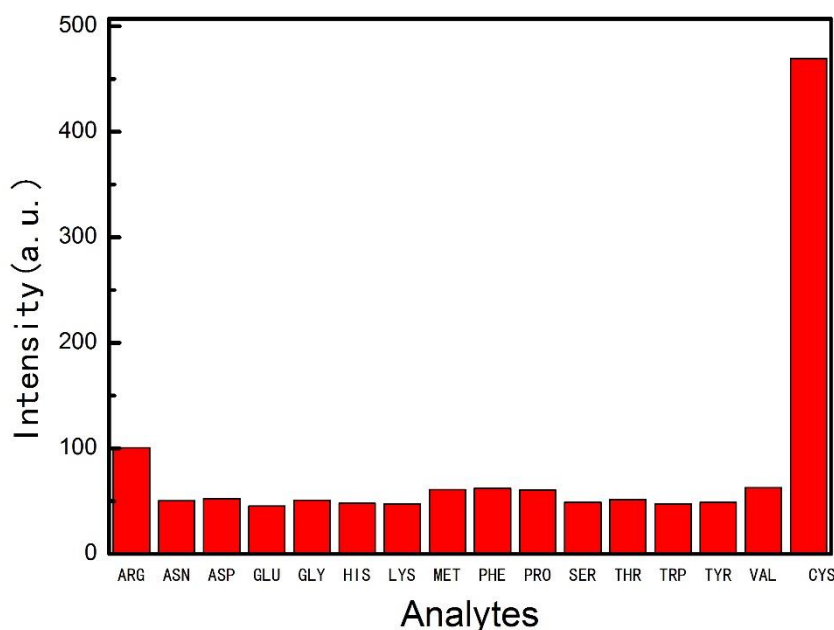


图 3.3 各种氨基酸对探针 B 荧光强度的影响

我们也对探针 B 与其他氨基酸之间的选择性进行了测试实验。将各种氨基酸配置成储备溶液(浓度为  $20 \times 10^{-4}$  M)且稀释到实验所需的浓度  $2.0 \times 10^{-5}$  M。取 16 个相同的 10 ml 试剂瓶,每个试剂瓶分别移取 5 ml 探针母液与同量的不同氨基酸储备溶液,用缓冲溶剂定容,摇匀,

体系于室温下稍加搅拌后, 将一系列平等样转移到 1 cm 比色皿中进行荧光发射光谱的测定。对分子探针 B 与各种氨基酸作用后的荧光强度进行比对。

图 3.3 就是探针 B (10  $\mu$ M)和其它氨基酸如 Arg, Asn, Asp, Glu, Gly, His, Lys, Met, PHe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val 等在二甲亚砜-HEPES 缓冲溶液(pH 7.04, 1:2, v/v)中响应的荧光光谱, 从图中可以发现, Cys 对探针 B 有强烈的荧光响应, 其它氨基酸则没有发生明显响应。这一现象表明, 探针 B 对半胱氨酸有着高度的专一选择性。

### 3.3.3 细胞成像

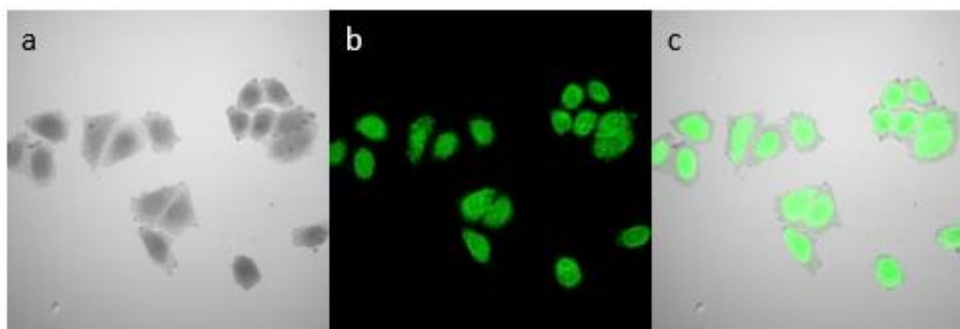


图 3.4 共聚焦显微成像

a)明场图片 b) 暗场荧光图片 c) a 和 b 的叠加图片

为了进一步探究探针 A 在生物中的应用, 我们进行了细胞半胱氨酸的荧光共聚焦显微成像研究(图 3.4)。探针 B 在 heLa 细胞中孵育 30 分钟后可看到细胞中有非常明显的黄绿色荧光出现(图 3.4b), 这表示细胞内有一定浓度的 Cys 存在, 且探针 B 有非常好的细胞膜穿透性。由此可见, 实验表明探针 B 可以被应用于细胞内 Cys 的荧光成像研究。

## 3.4 本章小结

在本章中, 利用马来酰亚胺与 Cys 的特异性化学反应, 设计并并通过硝化、还原和取代三步合成了一种基于 PET 机理的反应型目标分子探针, 并对其光谱性质进行了系统的研究。由于氨基的吸电子影响, 探针 B 几乎无荧光。随着半胱氨酸的加入, 探针中的马来酰亚胺与半胱氨酸发生迈克尔加成反应, PET 过程被破坏, 探针分子的荧光明显增高至 134.7 倍。该探针对半胱氨酸具有高度识别性且不受其他氨基酸的影响, 实现了对半胱氨酸的高度、灵敏

选择性的检测。较之以前报道过的 Cys 探针，本研究具有合成简便、专一性好、且辨识度高等优点。

## 第四章 基于 PET 过程的过氧化氢反应型荧光探针

活性氧(reactive oxygen species, ROS)一般是指生物体中含有比氧原子氧化还原活性更高的物质。活性氧在体内的产生过程如图 1 所示<sup>[118]</sup>。生物体内的活性氧主要由分子氧经过线粒体呼吸链并通过电子的传递而产生。除线粒体外,还有内源性产生的途径,其中主要包括脂氧合酶系统、 $\gamma$ -谷氨酰转肽酶系统和环氧合酶系统等<sup>[119]</sup>。

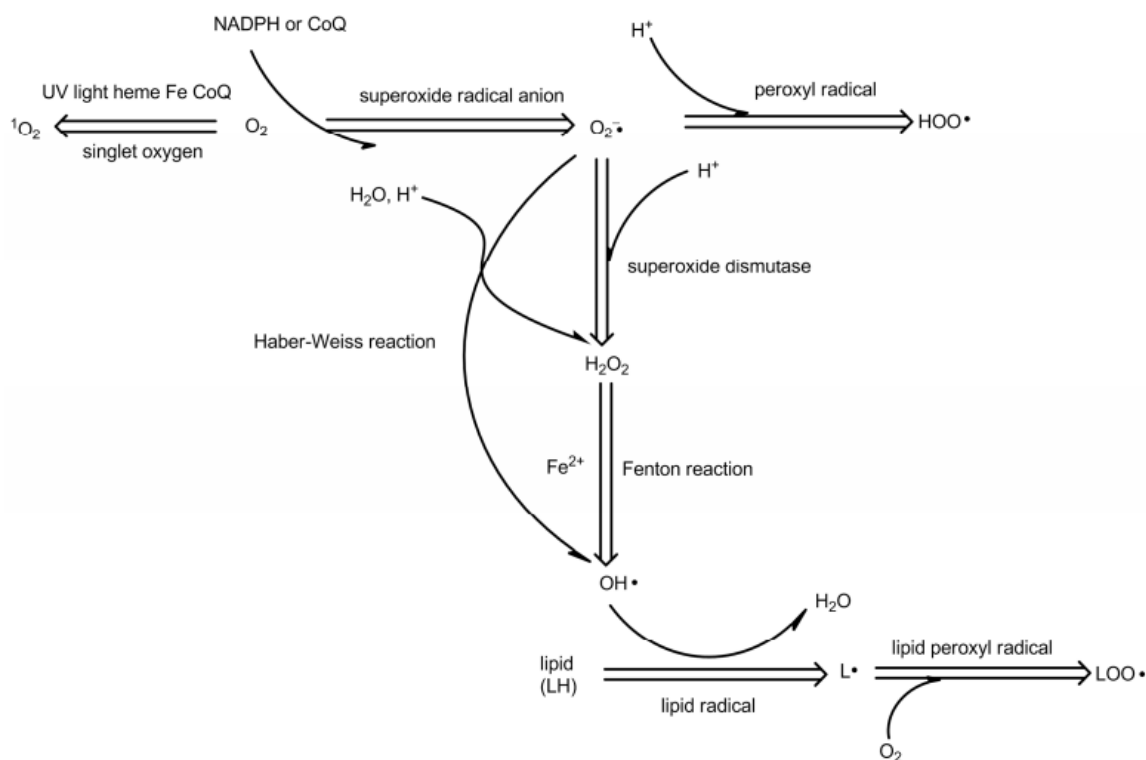


图 4.1 活性氧在体内的产生过程

过氧化氢做为最稳定的活性氧中成员之一,也是一种不可避免的代谢副产物。过氧化氢在生长因子,激素和细胞因子等很多氧化应激反应中扮演着重要的调节作用。细胞内经特定酶调控保持一定的过氧化氢浓度,对生物正常的生理过程又尤为重要,它们参与细胞信号转导、超敏反应、生长调节、合成生物物质及细胞凋亡等过程。另一方面,过氧化氢作为信号分子参与调节体制内多种疾病问题,它也可与细胞内的大分子发生反应,引起 DNA 的损伤、细胞膜脂质过氧化、酶和蛋白质变性等问题,最终导致诸如阿尔茨海默氏综合征<sup>[120-127]</sup>、神经退化性帕金森氏症等多种疾病的产生。由此可见,实时准确地检测生物体内过氧化氢的含量对疾病的预防、诊断具有非常重要的意义。

然而, 由于过氧化氢寿命短、活性高, 通常情况下不易捕捉, 因此难以被检测。目前, 报道的检测过氧化氢的方法很多, 如: 电子自旋共振法(ESR)<sup>[128-129]</sup>、高效液相色谱法(HPLC)<sup>[130]</sup>、分光光度法、化学发光法及荧光法等。荧光法具有简单易行、选择性好、灵敏度高、数据易采集等众多优点, 更令人欣喜的是荧光分子探针还可以进入细胞, 且不破坏生物体活性。在细胞内与目标靶分子过氧化氢相结合后结构发生变化, 相应的荧光波长也发生改变, 并借助共聚焦技术, 使细胞内过氧化氢的“可视化”变为可能, 从而也实现了过氧化氢在生物体的实时检测<sup>[131-132]</sup>。因此, 设计合成具有灵敏度高、选择性好、生物兼容性好的荧光探针分子, 用于检测活体或细胞内的过氧化氢是生化学科中非常具有挑战性的课题。

## 4.1 分子设计

如上章所示, 茚因多种优异性能引起人们广泛的关注, 茚酰亚胺作为茚的衍生物同样也受到人们很大的兴趣。茚酰亚胺类的化合物因具有稠环, 大共轭  $\pi$  体系的结构使其拥有优异的光电性能, 由于其发光在红光区域, 且具有很高的荧光量子产率等特点使这类化合物的合成、性质研究和应用成为研究的热点并广泛开展。

茚酰亚胺类化合物的数量非常大, 但其结构却较为单一。其基本结构都含有茚中心环, 具有大  $\pi$ - $\pi$  共轭电子结构, 其中  $\pi$  电子在有机分子中是离域的状态, 故  $\pi$  电子云具有极高的极化率。所以,  $\pi$  电子云之间的相互作用可使  $\pi$  电子在分子之间形成离域带, 进而使具有  $\pi$  共轭电子结构的分子在磁性、导电、光电转换、光学性质等方面具有良好的发展前景。

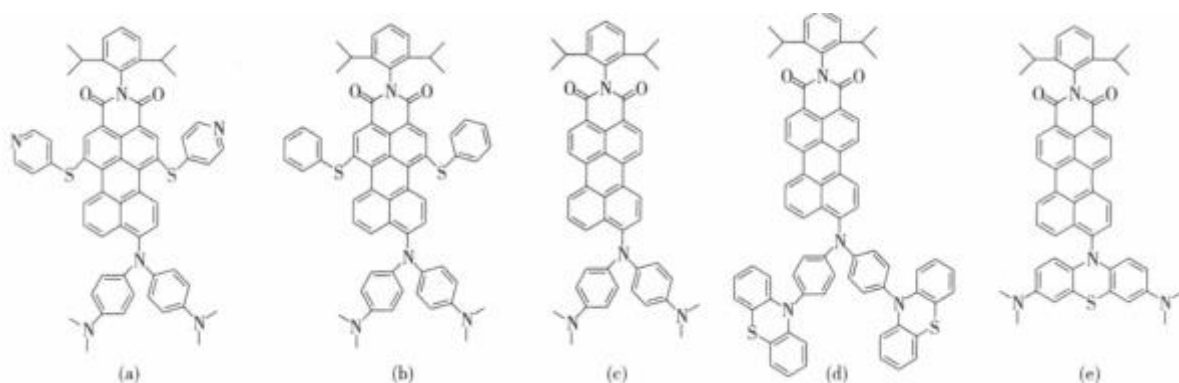


图 4.2 新型茚酰亚胺衍生物

以硼酸酯为识别基团的反应机制可对过氧化氢进行特异性识别。其反应机理如图 4.3 所示, 过氧化氢在电离过程中会产生氢离子和过氧负离子, 富电子的过氧负离子亲合进攻硼酸

酯中缺电子的硼原子中心，从而使以硼原子为中心的四面体结构中的碳-硼键易发生亲电反应而断裂，得到一种含碳-氧-硼键的中间化合物，此中间化合物易水解得酚类化合物。硼酸酯与其他的活性氧均不发生反应，因而对过氧化氢具有很高的专一性。

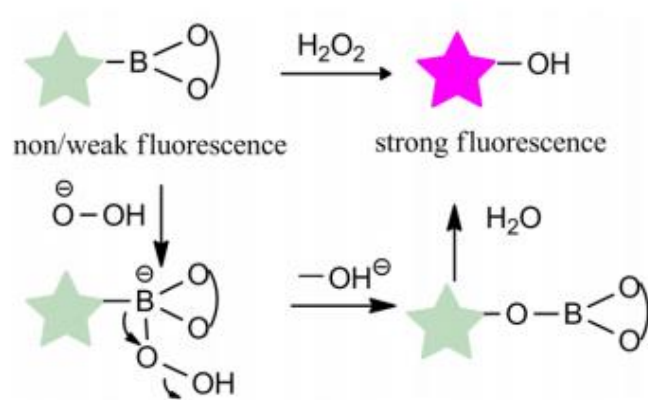


图4.3 硼酸酯与过氧化氢反应原理

综上所述，我们选择以苝酰亚胺为荧光母体结构、芳基硼酯为反应基团的近红外荧光探针，其荧光在反应前后可能发生“turn-on”，因此利用设计、合成的分子探针来对过氧化氢进活体或细胞成像分析的研究。

## 4.2 实验部分

### 4.2.1 试剂与仪器

表 4.1 实验使用的化学试剂

试剂	生产厂家	纯度
无水硫酸钠	国药集团化学试剂有限公司	分析纯
氯化钠	国药集团化学试剂有限公司	分析纯
碳酸钠	国药集团化学试剂有限公司	分析纯
氢氧化钾	国药集团化学试剂有限公司	分析纯
液溴	国药集团化学试剂有限公司	分析纯
甲醇	无锡亚盛化工有限公司	分析纯
乙醇	无锡亚盛化工有限公司	分析纯



石油醚	无锡亚盛化工有限公司	分析纯
二氯甲烷	无锡亚盛化工有限公司	分析纯
乙酸乙酯	无锡亚盛化工有限公司	分析纯
四氢呋喃	国药集团化学试剂有限公司	分析纯
1, 4-二氧六环	国药集团化学试剂有限公司	分析纯
茚四酸酐	安耐吉化学试剂有限公司	98.0%
N, N-二乙基乙二胺	安耐吉化学试剂有限公司	99.8%
Pd(dppf)Cl <sub>2</sub>	STREM 化学试剂有限公司	无
联硼酸频哪醇酯	安耐吉化学试剂有限公司	98%
N, N-二甲基甲酰胺	安耐吉化学试剂有限公司	分析纯
乙酸（冰醋酸）	国药集团化学试剂有限公司	99.5%

监控反应过程的薄层层析硅胶板（TLC），购自青岛邦凯分离材料有限公司（涂层厚度：0.15-0.2 mm，硅胶粉粒度：（HPTLC）： $8\pm 2\ \mu\text{m}$   $\geq 80\%$ ；（TLC）：10-40  $\mu\text{m}$ ，散射参数：SX=3，PH 值：6.2-6.8，型号：HSGF254，规格：20×20 cm，抗检出干扰。利用254 nm和365 nm的紫外光可以观察化合物。用来分离的硅胶粉（200~300目）购自烟台维启化工产品有限公司。

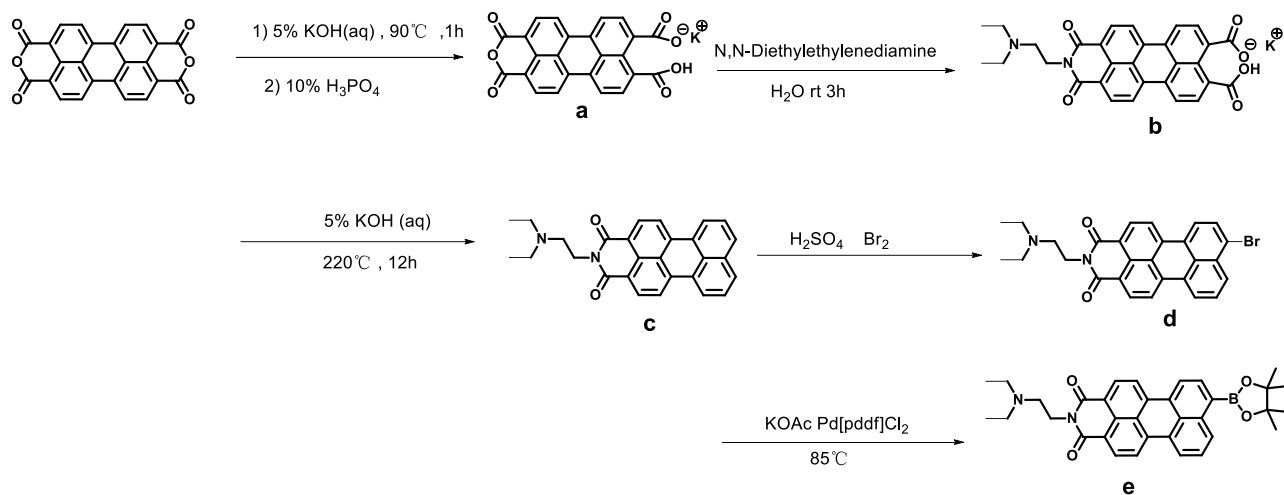
表4.2 使用的主要仪器表

仪器	生产厂家	型号	测试类型
气相色谱-质谱仪	日本岛津公司	GCMS-QP2010 Plus	
气相色谱仪	日本岛津公司	GC-2010	
自动进样器	日本岛津公司	AOC-20i	质谱分析
飞行时间质谱仪	日本岛津公司	MALDI-7090	
紫外-可见-近红外 吸收仪	日本岛津公司	UV-3600	光学分析
荧光分光光度仪	日本岛津公司	RF-530PC	

<sup>1</sup>HNMR 和 <sup>13</sup>CNMR 测试使用德国 Bruker 公司 DRX 400型核磁共振光谱仪，在400 MHz条件下样品溶解于氘代氯仿（CDCl<sub>3</sub>）中；化学位移以  $\delta$  记录，以四甲基硅烷(TMS) ( $\delta=0$  ppm) 为标准，谱图中裂分情况表示如下：s (singlet), d (doublet), t (triplet), 和m (multiplet)。

## 4.2.2 化合物的合成及结构表征

### (1) 合成路线



### (2) 具体合成步骤

#### (i) 化合物 a 的合成

两口瓶 (500 ml) 中, 依次加入茚四羧酸酐 (5.88 g, 0.015 mol) 和 5% 氢氧化钠 (3.36 g, 0.06 mol), 冷凝回流,  $90^\circ\text{C}$  条件下反应 1 h, 可观察到反应瓶中溶液颜色逐渐由鲜红色变为亮黄色。自然冷却到室温, 反应液加入 10% 磷酸调 PH 值至 4-4.5, 溶液颜色由亮黄色过度变至暗红色, 大量水洗, 抽滤得红色固体, 干燥并直接用于下一步。

#### (ii) 化合物 b 的合成

假设第一步的反应效率为 100%, 则可得到化合物 **a** (6.74g, 0.0135mol)。两口瓶 (500 ml) 中, 化合物 **a** (6.74g, 0.0135mol)、N, N-二乙基乙二胺 (4.84g, 0.055mol) 溶于 25 ml 水里, 室温下混合搅拌 3 h。反应结束, 用大量水多次反复冲洗后加入丙酮 (约 600 ml) 剧烈搅拌下混合回流 1 h, 沉淀过夜, 有红色固体析出, 溶液呈现绿色, 抽滤, 得砖红色固体滤饼。滤饼在  $120^\circ\text{C}$  下真空干燥一夜, 直接用于下步。

#### (iii) 化合物 c 的合成

假定第二步的反应效率为 90%, 可得到化合物 **b** (0.388 g, 0.0122 mol)。将化合物 **b** 和氢氧化钾 (0.388 g, 0.0069 mol) 置于 25 ml 密闭高温高压反应釜内于  $220^\circ\text{C}$  下反应 12 h。

冷却至室温，固体呈现黑色，溶液呈现绿色，大量水多次反复冲洗后，静置熟化，抽滤。所得滤饼 120℃ 下真空干燥一夜，柱层析分离得到橘红色固体，产率 10%。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.44 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 8.29 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 8.23 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.84 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.56 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H), 4.33 – 4.25 (m, 2H), 2.89 – 2.79 (m, 2H), 2.73 (q, *J* = 7.2 Hz, 4H), 1.15 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H).

#### (iv) 化合物 d 的合成

两口瓶 (250 ml) 中，化合物 c (360 mg, 0.9 mmol) 和浓硫酸 (20.8 ml) 混合物冷却至 -5℃，保持 -5℃ 条件下，注射器滴加液溴 (0.1 ml)，反应 1 h；TLC 薄层色谱监测观察反应情况。待反应完全后，向反应液中加入 80 ml 冰水混合物，剧烈搅拌条件下，用氢氧化钾调整溶液 PH 值至 8-9。静置片刻，抽滤并用 5% 的氨水 (aq) 进行洗涤。滤饼真空干燥后，在 1% 三乙胺/DMF 溶液中重结晶，柱层析分离得到红色固体，产率 42%。

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.33 (dd, *J* = 10.3, 8.1 Hz, 2H), 8.13 (dd, *J* = 8.0, 5.0 Hz, 2H), 8.06 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.98 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.85 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.70 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.56 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 4.36 – 4.25 (m, 2H), 2.87 (dd, *J* = 8.8, 6.6 Hz, 2H), 2.76 (q, *J* = 7.1 Hz, 4H), 1.18 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H).

#### (v) 化合物 e 的合成

反应瓶 (50ml) 中依次加入化合物 d (1.6 g, 2.97 mmol, 1 eq)，联硼酸频哪醇酯 (0.9 g, 3.54 mmol, 1.2 eq)，醋酸钾 (0.9 g, 与联硼酸频哪醇酯等质量)，溶解于 N, N-二甲基甲酰胺 (5 ml)，抽真空鼓氮气三次，加入催化剂 Pd(dppf)Cl<sub>2</sub> (30 mg)，再次抽真空至小气泡冒出。85℃ 下反应 8 h。TLC 薄层色谱监测反应。待反应完全后，二氯甲烷进行萃取，干燥，浓缩，柱层析得红色固体。

### 4.3 结果与讨论

对反应所得产物进行质谱分析发现，混合物中存在我们的目标分子化合物，证明我们反应路线的可行性。但是由于茚酰亚胺衍生物溶解性较差，且硼酸酯类化合物具有严重的吸附现象，故而目标产物与副产物经过多次重结晶和柱层析均未能进行有效的分离，期间尝试打浆也未取得明显效果，这与设计实验时的预期结果是不相符的。

### 4.4 本章小结

本文原意为设计合成一种过氧化氢荧光分子探针 C，并将其应用于过氧化氢体外及体内

的分析检测。合成过程中，我们通过核磁、质谱等分析手段对中间分子和目标分子探针进行了结构表征，由于各种原因，未能得到目标分子。总结实验失败原因：1、设计分子前，大量阅读文献，熟悉相关领域的进展，参照前人思想，确定最佳路线。2、实验过程中，发现问题，及时解决问题，严谨、认真对待每一次实验。

## 第五章 总结与展望

### 5.1 总结

本论文主要研究了具有不同性质和用途的三种新型荧光分子探针，其主要内容如下：

(1) 设计合成了具有大共轭体系对一氧化氮进行特异性识别的探针 A，通过核磁、质谱等分析方法对中间化合物和目标分子探针进行了结构表征。探针对于体外及生物体内的一氧化氮都有很好的响应。此探针还具有很高的灵敏度和专一性，在荧光光谱和吸收光谱上分别表现出了明显的红移。通过对检测液的飞行时间质谱进行表征，验证了我们对于分子探针设计的合理与可行性。当探针分子遇到一氧化氮后，芳香邻二氨基与 NO 分子发生分子内环化成三唑结构，PET 过程被阻断，从而使富电子的芳香胺转变成弱给电子性特性，荧光强度显著增强，因此对一氧化氮能够进行特异性识别。

(2) 设计合成了一种反应型半胱氨酸目标分子探针 B，并对其结构和光学性质进行了表征确认。由于氨基吸电子的影响，荧光探针 B 几乎无荧光。随着半胱氨酸的加入，探针分子结构中的马来酰亚胺与 Cys 发生迈克尔加成反应，PET 过程被破坏掉，探针分子的荧光强度明显增加，高至 134.7 倍。该探针对 Cys 具有高度的专一性且不受其他氨基酸的影响，完成了对半胱氨酸高度、灵敏性的检测。

(3) 设计了一种以苝酰亚胺为荧光团，硼酸酯为识别基团的过氧化氢荧光分子探针。但是，反应合成的产物未能纯化出来，与设计实验时的预期结果是不相符的。因此，实验方案有待改进以期获得满意的结果。

### 5.2 展望

分析化学是运用扎实的理论知识和先进的实验水平来检测物质的含量、结构及形态的一门学科，荧光探针则是分析化学中的一个举足轻重的分支。荧光分析法以其选择性好、灵敏度高，还可实时、原位检测等优点使其得到了飞速的发展。在生物上的应用对分子探针提出了更高的要求，优异的探针还应具备以下特点：斯托克斯位移大，合适的发射波长，吸收、发射光谱与常用宽场、共聚焦或双光子显微镜高度匹配。

荧光探针可对多种分析物进行体、内外检测，确定其含量及生理意义。设计合成更多具

有优异性能的荧光探针对临床医学的诊断、病理研究及药物筛选等方面的发展有着非常重要的理论和现实意义。

## 参考文献

- [1] Feng Y, Cheng J, Zhou L, et al. Ratiometric optical oxygen sensing: a review in respect of material design[J]. *Analyst*, 2012, 137(21): 4885-4901.
- [2] He H, Mortellaro M A, Leiner M J, et al. A fluorescent chemosensor for sodium based on photoinduced electron transfer[J]. *Analytical chemistry*, 2003, 75(3): 549-555.
- [3] Tong H, Wang L, Jing X, et al. Highly selective fluorescent chemosensor for silver (I) ion based on amplified fluorescence quenching of conjugated polyquinoline[J]. *Macromolecules*, 2002, 35(19): 7169-7171.
- [4] Coskun A, Akkaya E U. Ion sensing coupled to resonance energy transfer: a highly selective and sensitive ratiometric fluorescent chemosensor for Ag (I) by a modular approach[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2005, 127(30): 10464-10465.
- [5] Zhou Y, Yoon J. Recent progress in fluorescent and colorimetric chemosensors for detection of amino acids[J]. *Chemical Society Reviews*, 2012, 41(1): 52-67.
- [6] Suzuki Y, Morozumi T, Nakamura H, et al. New fluorimetric alkali and alkaline earth metal cation sensors based on noncyclic crown ethers by means of intramolecular excimer formation of pyrene[J]. *The Journal of Physical Chemistry B*, 1998, 102(40): 7910-7917.
- [7] Yang J-S, Lin C-S, Hwang C-Y. Cu<sup>2+</sup>-induced blue shift of the pyrene excimer emission: a new signal transduction mode of pyrene probes[J]. *Organic letters*, 2001, 3(6): 889-892.
- [8] Fabbriizzi L, Licchelli M, Pallavicini P, et al. A zinc (II)-driven intramolecular photoinduced electron transfer[J]. *Inorganic chemistry*, 1996, 35(6): 1733-1736.
- [9] Yapar G, Erk A. A study of the metal complexing of naphthalene-2, 3-crown ethers using fluorescence spectroscopy: Part III[J]. *Dyes and pigments*, 2001, 48(3): 173-177.
- [10] Perez - Inestrosa E, Desvergne J P, Bouas - Laurent H, et al. Barium cation complexation by flexible mono- and ditopic receptors, studied by UV absorption and fluorescence spectroscopy[J]. *European Journal of Organic Chemistry*, 2002, 2002(2): 331-344.
- [11] Kubo K, Sakaguchi S, Sakurai T. Synthesis, complexation, and fluorescence behavior of armed crown ethers carrying naphthyl group[J]. *Talanta*, 1999, 49(4): 735-744.
- [12] Silva A P. Direct detection of ion pairs by fluorescence enhancement[J]. *Chemical Communications*, 2003, (16): 2010-2011.
- [13] Ishikawa J, Sakamoto H, Wada H. Synthesis and silver ion complexation behavior of fluoroionophores containing a benzothiazolyl group linked to an N-phenylpolythiazaalkane moiety[J]. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, 1999, (6): 1273-1280.
- [14] Rurack K, Koval'chuk A, Bricks J L, et al. A simple bifunctional fluoroionophore signaling different metal ions either independently or cooperatively[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2001, 123(25): 6205-6206.
- [15] Descalzo A B, Martínez-Máñez R, Radeaglia R, et al. Coupling selectivity with sensitivity in an integrated chemosensor framework: design of a Hg<sup>2+</sup>-responsive probe, operating above 500 nm[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2003, 125(12): 3418-3419.
- [16] Rurack K, Kollmannsberger M, Resch-Genger U, et al. A selective and sensitive fluoroionophore for Hg<sup>II</sup>, Ag<sup>I</sup>, and Cu<sup>II</sup> with virtually decoupled fluorophore and receptor units[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2000, 122(5): 968-969.
- [17] He H, Mortellaro M A, Leiner M J, et al. A fluorescent sensor with high selectivity and sensitivity for potassium in water[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2003, 125(6): 1468-1469.
- [18] Choppinet P, Jullien L, Valeur B. Multichromophoric cyclodextrins as fluorescent sensors. Interaction of

- heptachromophoric  $\beta$ -cyclodextrins with surfactants[J]. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions* 2, 1999, (2): 249-256.
- [19] Choi M, Kim M, Lee K D, et al. A new reverse PET chemosensor and its chelatoselective aromatic cadmium[J]. *Organic letters*, 2001, 3(22): 3455-3457.
- [20] Fabbrizzi L, Licchelli M, Pallavicini P, et al. An anthracene - based fluorescent sensor for transition metal ions[J]. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 1994, 33(19): 1975-1977.
- [21] Prodi L, Montalti M, Zaccheroni N, et al. Dansylated polyamines as fluorescent sensors for metal ions: photophysical properties and stability of copper (II) complexes in solution[J]. *Helvetica Chimica Acta*, 2001, 84(3): 690-706.
- [22] Torrado A, Walkup G K, Imperiali B. Exploiting polypeptide motifs for the design of selective Cu (II) ion chemosensors[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1998, 120(3): 609-610.
- [23] Zheng Y, Huo Q, Kele P, et al. A new fluorescent chemosensor for copper ions based on tripeptide glycyl-histidyl-lysine (GHK)[J]. *Organic letters*, 2001, 3(21): 3277-3280.
- [24] Kim J S, Noh K H, Lee S H, et al. Molecular taekwondo. 2. A new calix [4] azacrown bearing two different binding sites as a new fluorescent ionophore[J]. *The Journal of organic chemistry*, 2003, 68(2): 597-600.
- [25] Ji H-F, Dabestani R, Brown G M. A supramolecular fluorescent probe, activated by protons to detect cesium and potassium ions, mimics the function of a logic gate[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2000, 122(38): 9306-9307.
- [26] De Silva A P, De Silva S A. Fluorescent signalling crown ethers; 'switching on' of fluorescence by alkali metal ion recognition and binding in situ[J]. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 1986, (23): 1709-1710.
- [27] De Silva A P, Gunaratne H N, Lynch P M, et al. Luminescence and charge transfer. Part 3. The use of chromophores with ICT (internal charge transfer) excited states in the construction of fluorescent PET (photoinduced electron transfer) pH sensors and related absorption pH sensors with aminoalkyl side chains[J]. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions* 2, 1993, (9): 1611-1616.
- [28] De Santis G, Fabbrizzi L, Licchelli M, et al. A fluorescent chemosensor for the copper (II) ion[J]. *Inorganica chimica acta*, 1997, 257(1): 69-76.
- [29] Gabe Y, Urano Y, Kikuchi K, et al. Highly sensitive fluorescence probes for nitric oxide based on boron dipyrromethene chromophore rational design of potentially useful bioimaging fluorescence probe[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2004, 126(10): 3357-3367.
- [30] Cosnard F, Wintgens V. A new fluoroionophore derived from 4-amino-N-methyl-1, 8-naphthalimide[J]. *Tetrahedron letters*, 1998, 39(18): 2751-2754.
- [31] Delmond S, Lédard J-F, Lapouyade R, et al. Cation-triggered photoinduced intramolecular charge transfer and fluorescence red-shift in fluorescence probes[J]. *New journal of chemistry*, 1996, 20(7-8): 861-869.
- [32] Valeur B, Leray I. Design principles of fluorescent molecular sensors for cation recognition[J]. *Coordination Chemistry Reviews*, 2000, 205(1): 3-40.
- [33] Kollmannsberger M, Rurack K, Resch-Genger U, et al. Ultrafast charge transfer in amino-substituted boron dipyrromethene dyes and its inhibition by cation complexation: a new design concept for highly sensitive fluorescent probes[J]. *The Journal of Physical Chemistry A*, 1998, 102(50): 10211-10220.
- [34] Grabowski Z R, Dobkowski J. Twisted intramolecular charge transfer (TICT) excited states: energy and molecular structure[J]. *Pure and Applied Chemistry*, 1983, 55(2): 245-252.
- [35] Rettig W. Charge separation in excited states of decoupled systems—TICT compounds and implications regarding the development of new laser dyes and the primary process of vision and photosynthesis[J]. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 1986, 25(11): 971-988.
- [36] Zachariasen K A, Druzhinin S I, Bosch W, et al. Intramolecular charge transfer with the planarized 4-aminobenzonitrile 1-tert-butyl-6-cyano-1, 2, 3, 4-tetrahydroquinoline (NTC6)[J]. *Journal of the American*



- Chemical Society, 2004, 126(6): 1705-1715.
- [37] Rappoport D, Furche F. Photoinduced intramolecular charge transfer in 4-(dimethyl) aminobenzonitrile-A theoretical perspective[J]. Journal of the American Chemical Society, 2004, 126(4): 1277-1284.
- [38] Léard J-F, Lapouyade R, Rettig W. Synthesis and photophysical study of 4-(N-monoaza-15-crown-5) stilbenes forming TICT states and their complexation with cations[J]. Pure and applied chemistry, 1993, 65(8): 1705-1712.
- [39] Léard J F, Delmond S, Lapouyade R, et al. New intrinsic fluoroionophores with dual fluorescence: DMABN - Crown4 and DMABN - Crown5[J]. Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas, 1995, 114(11 - 12): 517-527.
- [40] Collins G E, Choi L-S, Callahan J H. Effect of solvent polarity, pH, and metal complexation on the triple fluorescence of 4-(N-1, 4, 8, 11-tetraazacyclotetradecyl) benzonitrile[J]. Journal of the American Chemical Society, 1998, 120(7): 1474-1478.
- [41] Jonker S, Van Dijk S, Goubitz K, et al. Solid-state structure and spectroscopy of chromoionophoric acridinium derivatives[J]. Molecular Crystals and Liquid Crystals, 1990, 183(1): 273-282.
- [42] Kubo K, Kato N, Sakurai T. Synthesis and complexation behavior of diaza-18-crown-6 carrying two pyrenylmethyl groups[J]. Bulletin of the Chemical Society of Japan, 1997, 70(12): 3041-3046.
- [43] Kim S K, Bok J H, Bartsch R A, et al. A fluoride-selective PCT chemosensor based on formation of a static pyrene excimer[J]. Organic letters, 2005, 7(22): 4839-4842.
- [44] De Silva A, Nimal Gunaratne H, Gunnlaugsson T, et al. Molecular photoionic switches with an internal reference channel for fluorescent pH sensing applications[J]. New journal of chemistry, 1996, 20(7-8): 871-880.
- [45] Hennrich G, Walther W, Resch-Genger U, et al. Cu (II)-and Hg (II)-induced modulation of the fluorescence behavior of a redox-active sensor molecule[J]. Inorganic Chemistry, 2001, 40(4): 641-644.
- [46] Chen C-T, Huang W-P. A highly selective fluorescent chemosensor for lead ions[J]. Journal of the American Chemical Society, 2002, 124(22): 6246-6247.
- [47] Wang F, Banerjee D, Liu Y, et al. Upconversion nanoparticles in biological labeling, imaging, and therapy[J]. Analyst, 2010, 135(8): 1839-1854.
- [48] Yi G S, Chow G M. Synthesis of Hexagonal - Phase NaYF<sub>4</sub>: Yb, Er and NaYF<sub>4</sub>: Yb, Tm Nanocrystals with Efficient Up - Conversion Fluorescence[J]. Advanced Functional Materials, 2006, 16(18): 2324-2329.
- [49] Chen Z, Chen H, Hu H, et al. Versatile synthesis strategy for carboxylic acid-functionalized upconverting nanophosphors as biological labels[J]. Journal of the American Chemical Society, 2008, 130(10): 3023-3029.
- [50] Li Z, Zhang Y, Jiang S. Multicolor core/shell - structured upconversion fluorescent nanoparticles[J]. Advanced Materials, 2008, 20(24): 4765-4769.
- [51] Wang L, Yan R, Huo Z, et al. Fluorescence Resonant Energy Transfer Biosensor Based on Upconversion - Luminescent Nanoparticles[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2005, 44(37): 6054-6057.
- [52] Zhou Q, Swager T M. Fluorescent chemosensors based on energy migration in conjugated polymers: the molecular wire approach to increased sensitivity[J]. Journal of the American Chemical Society, 1995, 117(50): 12593-12602.
- [53] Trindade T, O'Brien P, Pickett N L. Nanocrystalline semiconductors: synthesis, properties, and perspectives[J]. Chemistry of Materials, 2001, 13(11): 3843-3858.
- [54] Emmerich H. Advances of and by phase-field modelling in condensed-matter physics[J]. Advances in Physics, 2008, 57(1): 1-87.
- [55] Baker S N, Baker G A. Luminescent carbon nanodots: emergent nanolights[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2010, 49(38): 6726-6744.
- [56] Tian L, Song Y, Chang X, et al. Hydrothermally enhanced photoluminescence of carbon nanoparticles[J]. Scripta Materialia, 2010, 62(11): 883-886.

- [57] Coto-García A M, Sotelo-González E, Fernández-Argüelles M T, et al. Nanoparticles as fluorescent labels for optical imaging and sensing in genomics and proteomics[J]. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2011, 399(1): 29-42.
- [58] Dubertret B, Calame M, Libchaber A J. Single-mismatch detection using gold-quenched fluorescent oligonucleotides[J]. *Nature biotechnology*, 2001, 19(4): 365-370.
- [59] Huang C C, Yang Z, Lee K H, et al. Synthesis of highly fluorescent gold nanoparticles for sensing mercury (II)[J]. *Angewandte Chemie*, 2007, 119(36): 6948-6952.
- [60] Liu Y, Wu D C, Zhang W D, et al. Polyethylenimine - grafted multiwalled carbon nanotubes for secure noncovalent immobilization and efficient delivery of DNA[J]. *Angewandte Chemie*, 2005, 117(30): 4860-4863.
- [61] Liu Z, Winters M, Holodniy M, et al. siRNA delivery into human T cells and primary cells with carbon - nanotube transporters[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2007, 46(12): 2023-2027.
- [62] Liu Z, Sun X, Nakayama-Ratchford N, et al. Supramolecular chemistry on water-soluble carbon nanotubes for drug loading and delivery[J]. *ACS nano*, 2007, 1(1): 50-56.
- [63] Leeuw T K, Reith R M, Simonette R A, et al. Single-walled carbon nanotubes in the intact organism: near-IR imaging and biocompatibility studies in *Drosophila*[J]. *Nano Letters*, 2007, 7(9): 2650-2654.
- [64] Liu H, Ye T, Mao C. Fluorescent carbon nanoparticles derived from candle soot[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2007, 46(34): 6473-6475.
- [65] Yang S-T, Cao L, Luo P G, et al. Carbon dots for optical imaging in vivo[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2009, 131(32): 11308-11309.
- [66] Richter-Addo G B, Legzdins P, Burstyn J. Introduction: nitric oxide chemistry[J]. *Chemical reviews*, 2002, 102(4): 857-860.
- [67] Richter-Addo G B. Binding of organic nitroso compounds to metalloporphyrins[J]. *Accounts of chemical research*, 1999, 32(6): 529-536.
- [68] Yi G-B, Khan M A, Richter-Addo G B. Metalloporphyrins with X [N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]-ligands. Novel high-spin (N-Phenyl-N-nitrosohydroxylaminato)(meso-tetraarylporphyrinato) iron (III)[J]. *Inorganic Chemistry*, 1995, 34(23): 5703-5704.
- [69] Smith R C, Tennyson A G, Lim M H, et al. Conjugated polymer-based fluorescence turn-on sensor for nitric oxide[J]. *Organic letters*, 2005, 7(16): 3573-3575.
- [70] Lim M H, Lippard S J. Copper complexes for fluorescence-based NO detection in aqueous solution[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2005, 127(35): 12170-12171.
- [71] Harrop T C, Song D, Lippard S J. Interaction of nitric oxide with tetrathiolato iron (II) complexes: relevance to the reaction pathways of iron nitrosyls in sulfur-rich biological coordination environments[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2006, 128(11): 3528-3529.
- [72] Shin J H, Privett B J, Kita J M, et al. Fluorinated xerogel-derived microelectrodes for amperometric nitric oxide sensing[J]. *Analytical chemistry*, 2008, 80(18): 6850-6859.
- [73] Shin J H, Metzger S K, Schoenfisch M H. Synthesis of nitric oxide-releasing silica nanoparticles[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2007, 129(15): 4612-4619.
- [74] Lim M H, Xu D, Lippard S J. Visualization of nitric oxide in living cells by a copper-based fluorescent probe[J]. *Nature chemical biology*, 2006, 2(7): 375-380.
- [75] Lim M H, Lippard S J. Metal-based turn-on fluorescent probes for sensing nitric oxide[J]. *Accounts of chemical research*, 2007, 40(1): 41-51.
- [76] Nagano T, Yoshimura T. Bioimaging of Nitric Oxide[J]. *Chemical Reviews*, 2002, 102(4): 1235-1270.
- [77] Fujii S, Yoshimura T. A new trend in iron-dithiocarbamate complexes: as an endogenous NO trapping agent[J]. *Coordination Chemistry Reviews*, 2000, 198(1): 89-99.
- [78] Brien J F, McLaughlin B E, Nakatsu K, et al. Chemiluminescence headspace-gas analysis for determination of

- nitric oxide formation in biological systems[J]. *Methods in enzymology*, 1996, 268: 83-92.
- [79] Fitzpatrick J, Kim E. Synthetic Modeling Chemistry of Iron–Sulfur Clusters in Nitric Oxide Signaling[J]. *Accounts of chemical research*, 2015, 48(8): 2453-2461.
- [80] Tekin N S, Ilter N, Sancak B, et al. Nitric oxide levels in patients with psoriasis treated with methotrexate[J]. *Mediators of inflammation*, 2006, 2006.
- [81] Maglio D H G, Paz M L, Ferrari A, et al. Skin damage and mitochondrial dysfunction after acute ultraviolet B irradiation: relationship with nitric oxide production[J]. *Photodermatology, photoimmunology & photomedicine*, 2005, 21(6): 311-317.
- [82] Toda N, Okamura T. The pharmacology of nitric oxide in the peripheral nervous system of blood vessels[J]. *Pharmacological Reviews*, 2003, 55(2): 271-324.
- [83] Wei C-C, Crane B R, Stuehr D J. Tetrahydrobiopterin radical enzymology[J]. *Chemical reviews*, 2003, 103(6): 2365-2384.
- [84] Bon C L, Garthwaite J. On the role of nitric oxide in hippocampal long-term potentiation[J]. *The Journal of Neuroscience*, 2003, 23(5): 1941-1948.
- [85] Pepicelli O, Raiteri M, Fedele E. The NOS/sGC pathway in the rat central nervous system: a microdialysis overview[J]. *Neurochemistry international*, 2004, 45(6): 787-797.
- [86] Chen X, Zhou Y, Peng X, et al. Fluorescent and colorimetric probes for detection of thiols[J]. *Chemical Society Reviews*, 2010, 39(6): 2120-2135.
- [87] Zhang S, Ong C-N, Shen H-M. Critical roles of intracellular thiols and calcium in parthenolide-induced apoptosis in human colorectal cancer cells[J]. *Cancer letters*, 2004, 208(2): 143-153.
- [88] Krauth - Siegel R L, Bauer H, Schirmer R H. Dithiol Proteins as Guardians of the Intracellular Redox Milieu in Parasites: Old and New Drug Targets in Trypanosomes and Malaria - Causing Plasmodia[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2005, 44(5): 690-715.
- [89] Lin W, Long L, Yuan L, et al. A ratiometric fluorescent probe for cysteine and homocysteine displaying a large emission shift[J]. *Organic letters*, 2008, 10(24): 5577-5580.
- [90] Van De Bittner G C, Bertozzi C R, Chang C J. Strategy for dual-analyte luciferin imaging: in vivo bioluminescence detection of hydrogen peroxide and caspase activity in a murine model of acute inflammation[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2013, 135(5): 1783-1795.
- [91] Huo F-J, Sun Y-Q, Su J, et al. Colorimetric detection of thiols using a chromene molecule[J]. *Organic letters*, 2009, 11(21): 4918-4921.
- [92] Van Meurs J B, Dhonukshe-Rutten R A, Pluijm S M, et al. Homocysteine levels and the risk of osteoporotic fracture[J]. *New England Journal of Medicine*, 2004, 350(20): 2033-2041.
- [93] Chen W, Zhao Y, Seefeldt T, et al. Determination of thiols and disulfides via HPLC quantification of 5-thio-2-nitrobenzoic acid[J]. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 2008, 48(5): 1375-1380.
- [94] Nekrassova O, Lawrence N S, Compton R G. Analytical determination of homocysteine: a review[J]. *Talanta*, 2003, 60(6): 1085-1095.
- [95] Zhu J, Dhimitruka I, Pei D. 5-(2-aminoethyl) dithio-2-nitrobenzoate as a more base-stable alternative to Ellman's reagent[J]. *Organic letters*, 2004, 6(21): 3809-3812.
- [96] Guo Y, Shao S, Xu J, et al. A specific colorimetric cysteine sensing probe based on dipyrromethane–TCNQ assembly[J]. *Tetrahedron letters*, 2004, 45(34): 6477-6480.
- [97] Chen Z-P, Peng Z-F, Jiang J-H, et al. An electrochemical amplification immunoassay using biocatalytic metal deposition coupled with anodic stripping voltammetric detection[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2008, 129(1): 146-151.
- [98] Ros-Lis J V, Garc á B, Jiménez D, et al. Squaraines as fluoro-chromogenic probes for thiol-containing compounds and their application to the detection of biorelevant thiols[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2004, 126(13): 4064-4065.

- [99] Zhang H, Wang P, Yang Y, et al. A selective fluorescent probe for thiols based on  $\alpha$ ,  $\beta$ -unsaturated acyl sulfonamide[J]. Chemical Communications, 2012, 48(86): 10672-10674.
- [100] Wang W, Escobedo J O, Lawrence C M, et al. Direct detection of homocysteine[J]. Journal of the American Chemical Society, 2004, 126(11): 3400-3401.
- [101] Han M S, Kim D H. Rationally designed chromogenic chemosensor that detects cysteine in aqueous solution with remarkable selectivity[J]. Tetrahedron, 2004, 60(49): 11251-11257.
- [102] Kim H N, Lee M H, Kim H J, et al. A new trend in rhodamine-based chemosensors: application of spirolactam ring-opening to sensing ions[J]. Chemical Society Reviews, 2008, 37(8): 1465-1472.
- [103] Xu Z, Chen X, Kim H N, et al. Sensors for the optical detection of cyanide ion[J]. Chemical Society Reviews, 2010, 39(1): 127-137.
- [104] Na  $\acute{\text{a}}$ kim H, Huyn  $\acute{\text{a}}$ soh J. Manipulation of fluorescent and colorimetric changes of fluorescein derivatives and applications for sensing silver ions[J]. Chemical Communications, 2009, (10): 1234-1236.
- [105] Jung  $\acute{\text{a}}$ ou M. Colorimetric and fluorometric detection of cationic surfactants based on conjugated polydiacetylene supramolecules[J]. Chemical Communications, 2009, (23): 3434-3436.
- [106] Gutscher M, Pauleau A-L, Marty L, et al. Real-time imaging of the intracellular glutathione redox potential[J]. Nature methods, 2008, 5(6): 553-559.
- [107] Monostori P, Wittmann G, Karg E, et al. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples: an in-depth review[J]. Journal of Chromatography B, 2009, 877(28): 3331-3346.
- [108] Montero D, Tachibana C, Winther J R, et al. Intracellular glutathione pools are heterogeneously concentrated[J]. Redox biology, 2013, 1(1): 508-513.
- [109] Yang Y, Huo F, Yin C, et al. Thiol-chromene click chemistry: A coumarin-based derivative and its use as regenerable thiol probe and in bioimaging applications[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2013, 47: 300-306.
- [110] Taki M, Iyoshi S, Ojida A, et al. Development of highly sensitive fluorescent probes for detection of intracellular copper (I) in living systems[J]. Journal of the American Chemical Society, 2010, 132(17): 5938-5939.
- [111] Kwon H, Lee K, Kim H-J. Coumarin-malonitrile conjugate as a fluorescence turn-on probe for biothiols and its cellular expression[J]. Chemical Communications, 2011, 47(6): 1773-1775.
- [112] Jung H S, Ko K C, Kim G-H, et al. Coumarin-based thiol chemosensor: synthesis, turn-on mechanism, and its biological application[J]. Organic letters, 2011, 13(6): 1498-1501.
- [113] Ko S-K, Chen X, Yoon J, et al. Zebrafish as a good vertebrate model for molecular imaging using fluorescent probes[J]. Chemical Society Reviews, 2011, 40(5): 2120-2130.
- [114] Shao J, Sun H, Guo H, et al. A highly selective red-emitting FRET fluorescent molecular probe derived from BODIPY for the detection of cysteine and homocysteine: an experimental and theoretical study[J]. Chemical Science, 2012, 3(4): 1049-1061.
- [115] Lu J, Sun C, Chen W, et al. Determination of non-protein cysteine in human serum by a designed BODIPY-based fluorescent probe[J]. Talanta, 2011, 83(3): 1050-1056.
- [116] Zhang X, Ren X, Xu Q-H, et al. One-and two-photon turn-on fluorescent probe for cysteine and homocysteine with large emission shift[J]. Organic letters, 2009, 11(6): 1257-1260.
- [117] Leung K-H, He H-Z, Ma V P-Y, et al. A luminescent G-quadruplex switch-on probe for the highly selective and tunable detection of cysteine and glutathione[J]. Chemical Communications, 2013, 49(8): 771-773.
- [118] Luo C, Zhou Q, Zhang B, et al. A new squaraine and Hg  $2^{+}$ -based chemosensor with tunable measuring range for thiol-containing amino acids[J]. New Journal of Chemistry, 2011, 35(1): 45-48.
- [119] Diehn M, Cho R W, Lobo N A, et al. Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells[J]. nature, 2009, 458(7239): 780-783.
- [120] Andersen J K. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence?[J]. 2004.
- [121] Honda K, Smith M A, Zhu X, et al. Ribosomal RNA in Alzheimer disease is oxidized by bound redox-active

- iron[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(22): 20978-20986.
- [122] Ding Q, Dimayuga E, Keller J N. Oxidative stress alters neuronal RNA-and protein-synthesis: implications for neural viability[J]. *Free radical research*, 2007, 41(8): 903-910.
- [123] Park L, Zhou P, Pitstick R, et al. Nox2-derived radicals contribute to neurovascular and behavioral dysfunction in mice overexpressing the amyloid precursor protein[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008, 105(4): 1347-1352.
- [124] Barnham K J, Masters C L, Bush A I. Neurodegenerative diseases and oxidative stress[J]. *Nature reviews Drug discovery*, 2004, 3(3): 205-214.
- [125] Krohn K, Maier J, Paschke R. Mechanisms of disease: hydrogen peroxide, DNA damage and mutagenesis in the development of thyroid tumors[J]. *Nature clinical practice Endocrinology & metabolism*, 2007, 3(10): 713-720.
- [126] Finkel T, Serrano M, Blasco M A. The common biology of cancer and ageing[J]. *Nature*, 2007, 448(7155): 767-774.
- [127] Galaris D, Skiada V, Barbouti A. Redox signaling and cancer: the role of “labile” iron[J]. *Cancer letters*, 2008, 266(1): 21-29.
- [128] Ottaviani M F, Spallaci M, Cangiotti M, et al. Electron paramagnetic resonance investigations of free radicals in extra virgin olive oils[J]. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2001, 49(8): 3691-3696.
- [129] Zhang L, Tang B, Ding Y. Study of 2-(2-pyridyl) benzothiazoline as a novel fluorescent probe for the identification of superoxide anion radicals and the determination of superoxide dismutase activity in scallion genus foods[J]. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2005, 53(3): 549-553.
- [130] Aoki S, Ito-Kuwa S, Nakamura K, et al. Chemiluminescence of superoxide generated by *Candida albicans*: differential effects of the superoxide generator paraquat on a wild-type strain and a respiratory mutant[J]. *Medical mycology*, 2002, 40(1): 13-19.
- [131] Zhan X-Q, Su B-Y, Zheng H, et al. Sensing hydrogen peroxide involving intramolecular charge transfer pathway: A boronate-functioned styryl dye as a highly selective and sensitive naked-eye sensor[J]. *Analytica chimica acta*, 2010, 658(2): 175-179.
- [132] Rhee S G, Chang T-S, Jeong W, et al. Methods for detection and measurement of hydrogen peroxide inside and outside of cells[J]. *Molecules and cells*, 2010, 29(6): 539-549.

## 附录 1 攻读硕士学位期间撰写的论文

- (1) Tingting Li, Dongliang Yang, **Liuqing Zhai**, Suiliang Wang, Baomin Zhao, Nina Fu,\* Lianhui Wang,\* Youtian Tao, Wei Huang\*. Thermally Activated Delayed Fluorescence Organic Dots (TADF Odots) for Time-Resolved and Confocal Fluorescence Imaging in Living Cells and in Vivo, submitted.

## 附录 2 攻读硕士学位期间申请的专利

(1) 汪联辉、赵保敏、翟柳青，一种基于多环芳烃 K 位并咪唑基的有机半导体材料的制备方法及应用，201610121688.8，2016.03.04。

### 附录 3 攻读硕士学位期间参加的科研项目

- (1) 国家自然科学基金青年基金项目, 水溶性共轭聚合物传感阵列构建及在癌症标志物蛋白检测中的应用 (51103074 )
- (2) 国家重大科学研究计划项目(973 项目), 基于纳米技术的肺癌早期检测研究-课题 1: 功能性纳米材料的制备和表面修饰 (2012CB933301)
- (3) 南京邮电大学国自基金孵化项目, 高选择性近红外过氧化氢荧光探针的设计、合成及荧光成像应用 (NY214080)



## 致谢

时光荏苒，弹指韶华，在一起的时光总显得那么短暂，回首已三年的时间，往事历历，思绪万千。曾经的稚嫩与迷茫，坚持与奋斗都留在了南邮材料院这片热土。

饮水思源，结草衔环，首先特别感谢我的导师赵保敏副教授，是赵老师在三年前不计我的薄弱与欠缺，接受我为课题组这个温馨大家庭的一员。赵老师在科研中为我们搭建了一个各方面都很优越的平台，实验中极具启发性，耐心而又博学，使我在专业领域学到了知识，开阔了视野；在生活上，赵老师和傅老师对我们也是无微不至的关怀，特别是当自己陷入困难遭受挫折时，总是耐心开导，谆谆告诫，学生无以言谢！

真诚的感谢南邮黄维院士、汪联辉教授及 IAM 团队，感谢你们当初历尽千辛万苦克服重重困难建立了如今的信息材料与纳米技术研究院，十年不长不短，润物细无声，桃李满天下。怀揣感恩之心向尊敬的两位老师和开拓奋进的 IAM 团队表达由衷的感谢和满满的祝福，祝两位老师幸福安康，IAM 团队再创辉煌。

感谢课题组的每一位小伙伴黄红艳师姐，何聪师姐，李亭亭，李劝，刘书利，石鑫，焦冠源，王一娇等师弟师妹们，很幸运我们在一起度过了难忘的研究生生活，点点滴滴，如是昨天。祝福彼此，梦想成真！

感谢我亲爱的父母和哥哥，你们的强大后盾使我衣食无忧，潜心汲取知识；感谢亲友，你们的支持与鼓励使我放手前行；感谢男友，身无彩凤双飞翼，心有灵犀一点通，相濡以沫的爱情是我珍惜生活，憧憬未来。我不会辜负你们的殷殷期盼，踏实奋进，积极乐观，一步一个台阶迈向理想。

最后，我还要向百忙之中为给我们做论文评审工作的全体专家和老师致以崇高的敬意，感谢你们！

二零一六年五月记于南邮

翟柳青