五甲川菁线粒体荧光探针: 光稳定性与激发态寿命的关系

黄海桥, 龙飒然, 李明乐, 杜健军, 樊江莉, 彭孝军*

大连理工大学精细化工国家重点实验室, 大连 116024

*通讯作者, E-mail: pengxj@dlut.edu.cn

收稿日期: 2017-03-24; 接受日期: 2017-04-18; 网络版发表日期: 2017-07-21

国家自然科学基金(编号: 21421005, U1608222)资助项目

摘要 不同结构的五甲川菁荧光染料常被用于近红外荧光探针, 其灵敏度高, 但光稳定性不理想. 本文合成了一系列中位引入电子给体对氨基苯或对羟基苯的五甲川菁染料, 研究了取代基对光稳定性的影响. 实验表明, 具有氨基和羟基电子给体的染料具有较高的光稳定性. 飞秒瞬态吸收实验证明, 氨基降低了菁染料分子的激发态寿命, 光稳定性与激发态寿命成负相关, 同时染料能较好地定位于活细胞中的线粒体. 这对设计高耐光牢度的新型菁染料探针具有重要意义.

关键词 菁染料, 光稳定性, 激发态寿命, 生物成像, 线粒体

1 引言

自从1856年Williams^[1]发现“豆粉”蓝菁染料以来, 由于此类染料具有吸收波长范围可调(540~1000 nm)、摩尔消光系数大、吸收及发射光谱范围可调、合成容易等优点, 被广泛应用于生物荧光分析^[2,3]及荧光成像^[4,5]. 虽然目前菁染料应用面较广, 但普遍存在光化学不稳定的缺点, 特别是近红外菁染料, 如五甲川(Cy5)、七甲川染料(Cy7)的光稳定性较差, 成为限制其产业大规模应用的不利因素^[6,7]. 因此, 研究和提高菁染料的光稳定性具有重要的理论和现实意义.

目前所知, 菁类染料光稳定性不足主要是染料分子被单线态氧氧化导致的, 而单线态氧可以由染料的

激发态与氧反应而形成. 前人研究发现, 通过外加单线态氧淬灭剂可以提高染料稳定性^[8]; 增加染料中间甲川链的空间位阻可以提高染料光稳定性; 在染料母体上引入氟、硝基、氰基等吸电子取代基, 可降低共轭芳环上的 π 电子云密度, 起到降低染料与单重态氧反应活性的作用^[9~11], 在一定程度上可以提高染料的光稳定性^[12,13].

本课题组认为, 降低激发态寿命, 可以减少染料激发态与氧形成单线态氧的几率, 有望提高染料的光稳定性. 为此, 合成了一系列对称中位苯环取代的五甲川菁染料, 通过改变苯环上取代基团、调节五甲川菁染料的激发态寿命来提升光稳定性, 并考察染料在细胞荧光成像的性能. 研究发现, 与传统研究结论相

引用格式: 黄海桥, 龙飒然, 李明乐, 杜健军, 樊江莉, 彭孝军. 五甲川菁线粒体荧光探针: 光稳定性与激发态寿命的关系. 中国科学: 化学, 2017, 47: 1035–1043
Huang H, Long S, Li M, Du J, Fan J, Peng X. Pentamethine cyanine located in mitochondria: relationship between photostability and excited state lifetime. *Sci Sin Chim*, 2017, 47: 1035–1043, doi: 10.1360/N032017-00061

反, 供电性可使五甲川菁染料光稳定性提高.

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

Bruker Avance II 400 Mz Specreometer (400 MHz) 核磁共振仪(Varian公司, 德国), HP1100LC/MSD质谱仪(HP公司, 美国), Cary 60紫外-可见分光光度计(Agilent公司, 美国), Cary Eclipse荧光光谱仪(Agilent公司, 美国), 绝对荧光量子产率仪(Hamamatsu公司, 日本), FV10-ASW激光共聚焦荧光显微镜(奥林巴斯公司, 日本).

MitoTracker Green FM和Hoechst 33342购买于Invitrogen公司(美国). 硅胶(200~300目)购于青岛美高集团有限公司(中国)用于柱层析. 除2-苯基丙二醛为Matrix Scientific公司(哥伦比亚)进口, 其他原料为国产工业级再提纯或国产分析纯试剂, 其中部分原料和溶剂经过纯化或干燥处理后再使用, 光谱测试中用的是分析纯溶剂和蒸馏去离子水, 用之前经过干燥重新蒸馏, 而且溶剂的光学吸收密度在0.1以下.

2.2 中间体及染料的合成

2.2.1 中间体的合成

(1) 中间体1-乙基-2,3,3-三甲基-3*H*-吡啶碘化盐**I-1**的合成. 将2,3,3-三甲基-3*H*-吡啶(7.955 g, 50 mmol)和碘乙烷(11.690 g, 75 mmol)加入到含25 mL甲苯的100 mL单口圆底烧瓶中, 氮气保护. 加热至回流持续反应, 过夜, 停止反应. 待反应液冷却至室温后, 加入50 mL乙醚过滤沉淀并用乙醚洗涤滤饼中的杂质. 干燥后得到11.173 g粉红色的固体粉末, 粗收率为71%. 产品未经进一步纯化, 直接用于下一步反应.

(2) 2-溴丙二醛二苯胺缩合剂的合成(**Ib-1**)^[14]. 取2,3-二溴-2-丁烯醛(5.116 g, 20 mmol)加入到盛有34 mL无水乙醇的100 mL两口烧瓶中, 磁力搅拌使其溶解后, 装上冷凝装置. 另取苯胺(3.908 g, 42 mmol)溶于18 mL无水乙醇中, 常温搅拌下用恒压滴液漏斗将苯胺溶液加入到两口瓶中, 至少滴加10 min, 溶液颜色很快由无色变成黄绿色, 有大量的气泡冒出, 并且放出大量的热, 可以观察到冷凝管上有溶剂回流, 加入完毕后继续在40℃的反应条件下搅拌1 h, 温度逐渐降低冷却, 析出金黄色固体, 在强力搅拌下加入50 mL乙

醚, 过滤后滤饼用乙醇重结晶得到纯的缩合剂, 干燥后得产品5.130 g, 收率为85%.

2.2.2 染料合成

(1) 染料**II-1**的合成(1,5-二(1,1'-二乙基-3,3,3',3'-四甲基-3*H*-吡啶)-3-溴-二碳菁染料, 碘化盐). 取1-乙基-2,3,3-三甲基-3*H*-吡啶碘化盐(1.260 g, 4 mmol)和丙二醛二苯胺盐酸盐缩合剂(0.602 g, 2 mmol), 加入到100 mL单口烧瓶中, 然后加入无水醋酸钠(0.340 g, 4 mmol)和20 mL醋酸酐, 磁力搅拌使其溶解后, 装上冷凝装置. 氮气保护下加热到110℃, 溶液颜色很快变为蓝色, 反应30 min后停止加热, 自然冷却至室温. 用饱和食盐水洗涤, 分出有机层, 水层用二氯甲烷多次萃取, 然后与先前的有机层合并, 用无水硫酸钠干燥, 过滤掉干燥剂, 将溶剂旋转蒸发至蒸干, 残留液用少量二氯甲烷溶解, 硅胶柱层析分离纯化用无水甲醇/二氯甲烷(1/80, v/v)展开剂冲洗, 收集蓝色组分, 蒸干后为带有金属光泽的蓝色染料, 得到0.865 g产品, 产率为70%.

¹H NMR (400 MHz, MeOD): δ 8.41 (d, $J=13.3$ Hz, 2H, CH), 7.56 (d, $J=7.4$ Hz, 2H, ArH), 7.46 (t, $J=7.6$ Hz, 2H, ArH), 7.40 (d, $J=7.8$ Hz, 2H, ArH), 7.33 (t, $J=7.4$ Hz, 2H, ArH), 6.49 (d, $J=13.3$ Hz, 2H, CH), 4.24 (q, $J=7.2$ Hz, 4H, CH₂), 1.76 (s, 12H, CH₃), 1.45 (t, $J=7.2$ Hz, 6H, CH₃). HRMS-ESI: m/z calcd. M^+ for C₂₉H₃₄BrN₂⁺, 489.1900; found, 489.1891. ¹³C NMR (100 MHz, MeOD) δ 175.84, 151.18, 143.08, 142.81, 129.91, 127.04, 123.62, 116.93, 112.42, 103.30, 51.09, 40.58, 27.45, 12.39.

(2) 染料**II-PHOH**的合成(1,5-二(1,1'-二乙基-3,3,3',3'-四甲基-3*H*-吡啶)-3-(4-羟基苯基)-二碳菁染料, 碘化盐)^[15,16]. 取**II-1** (0.100 g, 0.162 mmol)和对羟基苯硼酸(0.045 g, 0.324 mmol)于50 mL两口圆底烧瓶中, 依次向其中加入K₂CO₃ (0.067 g, 0.487 mmol)和四三苯基磷氯化钼(0.019 g, 0.016 mmol), 最后加入DMF:H₂O=1:1的溶剂3 mL, 氮气保护下80℃反应4 h, 薄层色谱(TLC)监控, **II-1**基本反应完全, 停止反应. 冷却至室温, 先用水洗涤产物, 再用二氯甲烷萃取(20 mL×3), 无水Na₂SO₄干燥, 旋转蒸发除去溶剂, 硅胶柱层析分离纯化用无水甲醇/二氯甲烷(1/60, v/v)展开剂冲洗, 收集蓝色组分, 蒸干后为带有金属光泽的蓝色染料, 得0.035 g产品, 产率为34%.

¹H NMR (400 MHz, CD₂Cl₂) δ 7.96 (d, $J=13.9$ Hz, 2H, CH), 7.42 (d, $J=7.4$ Hz, 2H, ArH), 7.39 (m, 2H, ArH),

图2 染料的合成路线

图3 光稳定性实验装置示意图(网络版彩图)

一个大的玻璃展开缸(厚为5 cm), 样品距离玻璃展开缸为5 cm, 里面盛有50 g/L的亚硝酸钠水溶液^[17], 用作滤光器, 滤去400 nm以下的紫外光, 同时可以起到冷阱的作用, 隔断碘钨灯的强热。在紫外可见分光光度仪上测出样品照射前后的吸光度值, 根据吸光度值随光照时间的下降速度来比较样品的光稳定性。

2.5 染料的瞬态吸收光谱测试

飞秒瞬态吸收光谱是在自行搭建的飞秒宽带泵浦探测仪器测试得到。激发波长为600 nm, 脉冲宽度

为50 fs。进行泵浦探测实验前, 调整染料溶液的浓度, 使其在1 mm厚的石英样品池中, 600 nm处吸光度为0.12~0.15 OD。

2.6 细胞孵育和复染实验

将可传代的人乳腺癌细胞系(MCF-7)接种在共聚焦皿上, 在适量的培养液中培养(37℃, 5% CO₂) 24 h后, 用磷酸盐缓冲溶液(PBS)冲洗共聚焦皿3次, 移除缓冲溶液, 然后加入新鲜培养基培养细胞以供后续实验。

将接种好的MCF-7细胞与0.2 μmol/L的MitoTracker Green FM以及1.0 μmol/L的染料依照上述的染色操作孵育20 min, 再将2.0 μg/mL的核酸染料Hoechst 33342加入上述细胞继续孵育10 min, 移除培养基, 用PBS缓冲溶液将细胞洗涤3次, 向共聚焦皿中加入新鲜的培养基, 然后使用放大倍数为60倍的油镜作为物镜, 分别拍摄其明场和荧光图像。

3 结果与讨论

3.1 染料的光谱性能

染料在不同溶剂中的吸收和发射性质见表1, 染料II-PH、II-PHOH和II-PHNH₂的最大吸收和发射峰(均在650和670 nm), 说明中位取代基对其波长影响较小, 并且各染料在不同溶剂中的紫外吸收和发射光谱的变化规律一致。在醇类等质子性溶剂中, 随溶剂极性增大, 如从甲醇、乙醇到水, 染料的紫外-可见吸收和发射光谱发生蓝移, 表现为负溶剂化效应。如图4所示, 染料II-PHNH₂的最大吸收峰在乙醇、甲醇和水(极性: 乙醇4.3, 甲醇6.6, 水10.2)中分别为647、643和639 nm。

从表1中染料的荧光量子产率可以看出, 3个染料在二氯甲烷(DCM)、乙腈等有机溶剂中的荧光量子产率均比水中高, 这是由于染料与水分子之间相互作用, 染料的非辐射衰减过程增加所致。对于五甲川菁染料而言, 吡啶环之间亚甲基链的顺反异构化是非辐射衰减的主要方式, 染料与水分子的作用使得染料分子的扭曲角增大, 破坏了分子的共平面性, 导致非辐射衰减过程的增加, 造成能量损耗, 从而使染料在水中的荧光有比较明显的猝灭^[18]。

同时可以看出, II-PHOH (0.075, DCM) 和 II-PHNH₂ (0.023, DCM) 的荧光量子产率明显小于 II-PH (0.157, DCM), 说明中位苯环取代对菁染料激发

图 4 染料的吸收和发射图谱(网络版彩图)

表 1 染料在不同溶剂中的光谱性能

染料	溶剂 ^{a)}	$\lambda_{\text{abs}}^{\text{b)}$ (nm)	$\lambda_{\text{em}}^{\text{c)}$ (nm)	斯托克斯位移 (nm)	$\Phi_{\text{f}}^{\text{d)}$	$\epsilon^{\text{e)}$ ($10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ L}$)
II-PH	二氯甲烷	652	672	20	0.157	2.87
	乙腈	639	661	22	0.061	2.65
	乙醇	644	663	19	0.096	2.79
	甲醇	639	662	23	0.061	2.91
	水	637	658	22	0.038	2.68
	二甲基亚砜	647	668	21	0.157	2.57
II-PHOH	二氯甲烷	652	676	24	0.075	1.40
	乙腈	642	667	25	0.043	1.64
	乙醇	646	670	24	0.053	1.50
	甲醇	641	667	26	0.037	1.70
	水	638	661	23	0.028	1.26
	二甲基亚砜	650	675	25	0.129	1.39
II-PHNH ₂	二氯甲烷	656	679	23	0.023	2.24
	乙腈	645	668	23	0.012	2.19
	乙醇	647	669	22	0.011	2.11
	甲醇	643	664	21	0.009	2.18
	水	639	661	22	0.008	1.77
	二甲基亚砜	652	669	17	0.009	1.65

a) 所有光谱测试温度为25℃; b) 最大吸收波长; c) 最大发射波长; d) 测试浓度为1.0 $\mu\text{mol/L}$; e) 摩尔消光系数

态基本无影响, 但是当中位苯环对位引入羟基和氨基后对菁染料甲川链母体结构有明显的荧光猝灭。

3.2 染料光稳定性测试

本文研究了3个不同取代基团的菁染料在水中的光降解性质。染料的光稳定测试结果如图5所示, 染料在水中, 经碘钨灯照射4 h, 各染料的剩余吸光率顺序是: **II-PH** (4%) < **II-PHOH** (12%) < **II-PHNH₂** (60%), 计算染料的光降解速率常数分别是: **II-PH** (0.78) > **II-PHOH** (0.54) > **II-PHNH₂** (0.12)。结果表明, 染料**II-PHNH₂**具有最高的光稳定性, 其次是**II-PHOH**、**II-PH**。但由于氨基是供电基团, 与传统吸电基团有利于光稳定性的预测相反。因此, 对于该分子体系而言, 可能存在其他影响光稳定性的因素。

3.3 染料瞬态吸收测试

菁染料的光降解主要是由于共轭链受到单线态

氧的进攻氧化造成的。而单线态性氧往往产生于染料的激发态。分子激发态寿命短, 可降低单线态氧的生成。因此, 根据飞秒瞬态吸收测试系统, 测得3种染料在DMSO和水中的瞬态吸收和动力学图谱, 并对其激发态寿命进行拟合, 结果如图6所示。

从表2中可以看出, 3种染料在DMSO中的激发态寿命长短顺序为: **II-PH** (619.5 ps) > **II-PHOH** (525.2 ps) > **II-PHNH₂** (19.8 ps), 在水中激发态寿命也保持相同的长短顺序, 与染料光降解速率一致, 表明染料激发态寿命越短, 光稳定性越好。同时从荧光量子产率可以看出, 对氨基苯取代之后的菁染料荧光量子产率最低, 说明其激发态通过辐射跃迁回到基态过程所占比重最少, 主要通过非辐射跃迁, 降低激发态寿命。氨基引入, 可与菁染料母体构成分子内光诱导电子转移(PET)效应, 这是一个皮秒级过程, 缩短了染料在激发态停留时间, 也就降低了处于激发态的染料与氧反应的几率, 提高其光稳定性。

3.4 细胞成像

目前大多数线粒体定位类荧光探针是基于线粒体负膜电位特性, 利用本身带有正电荷的荧光团或在荧光团中引入带有正电荷基团, 实现对线粒体的染色, 其中最为常用的是三苯基膦正电荷基团^[19]。由于菁染料本身带一个正电荷, 猜测它会进入线粒体, 因此对其进行了线粒体复染实验。

将**II-PHNH₂**与商品化的核酸Hoechst 33342和线粒体染料MitoTracker Green FM在MCF-7细胞中进行复染实验。实验结果如图7所示, **II-PHNH₂**和线粒体染料MitoTracker Green FM能很好地复染于细胞线粒体, 其皮尔森复染系数 $R=0.97$, 说明染料**II-PHNH₂**能够很好地对活细胞的线粒体进行选择性地定位染色。

4 结论

本文研究了3例中位取代的Cy5菁染料, 对其光稳定性进行分析, 并研究其光稳定性与其激发态寿命之间的关系, 发现中位氨基苯取代的菁染料大大提升其光稳定性, 主要是由于氨基与菁染料母体形成分子内PET效应, 降低了其激发态寿命, 从而提高其光稳定性。同时发现, 此类菁染料能定位细胞线粒体, 这对细胞线粒体长时间成像研究具有潜在的应用价值。

图5 染料的光稳定性测试结果, 溶剂为水。(a) 染料残余吸收/初始吸收(A_t/A_0)与光照时间的关系; (b) 染料 $\ln(A_0/A_t)$ 与光照时间的关系(网络版彩图)

图6 染料在DMSO和水中的飞秒时间分辨瞬态吸收光谱, $\lambda_{\text{ex}}=600\text{ nm}$ 及其对应波长处的激发态吸收动力学衰减曲线(网络版彩图)

表2 染料在DMSO和水中对应的激发态寿命和其荧光量子产率

Dyes	τ (ps) DMSO	τ (ps) 水	Φ_f DMSO	Φ_f 水
II-PHNH ₂	19.8	26.2	0.009	0.008
II-PHOH	525.2	63.0	0.129	0.028
II-PH	619.5	186.5	0.157	0.038

图 7 染料II-PHNH₂ (1.0 μmol/L)、商品化线粒体染料MitoTracker Green FM (0.2 μmol/L)和核酸Hoechst 33342 (2.0 μg/mL)在MCF-7细胞中的激光共聚焦成像图。(a) Hoechst 33342染色10 min; (b) MitoTracker Green FM染色30 min; (c) 明场图; (d) 染料II-PHNH₂染色30 min; (e) (a)~(c)的叠加图; (f) 共区域化分析。标尺为20 μm。商业化线粒体染料MitoTracker Green FM的激发波长为488 nm, 接收波段为500~530 nm; 商业化染料Hoechst 33342的激发波长为405 nm, 接受波段为440~480 nm; 染料的激发波长为635 nm, 接收波段为655~755 nm (网络版彩图)

参考文献

- Williams CG. *Trans R Soc Edinb*, 1857, 21: 377–401
- 张鹏超, 王升, 吴品, 汤昆, 张付利. 化学通报, 2016, 5: 455–458
- Lv W, Chen XD, Aumiler D, Xia AD. *Sci China Ser B-Chem*, 2009, 52: 1148–1153
- Yuan L, Lin W, Zheng K, He L, Huang W. *Chem Soc Rev*, 2013, 42: 622–661
- 李春兰, 王兰英, 孙国峰, 张祖训. 有机化学, 2006, 4: 442–453
- Schuler B, Pannell LK. *Bioconjugate Chem*, 2002, 13: 1039–1043
- Horiuchi H, Ishibashi S, Tobita S, Uchida M, Sato M, Toriba K, Otaguro K, Hiratsuka H. *J Phys Chem B*, 2003, 107: 7739–7746
- 曾万学, 陈萍, 盛丽琴, 张理, 郑德水, 冈崎庸树, 速水正明. 中国科学: 化学, 1995, 6: 579–584
- Pascal S, Haeefe A, Monnerau C, Charaf-Eddin A, Jacquemin D, Le Guennic B, Andraud C, Maury O. *J Phys Chem A*, 2014, 118: 4038–4047
- Ornelas C, Lodescar R, Durandin A, Canary JW, Pennell R, Liebes LF, Weck M. *Chem Eur J*, 2011, 17: 3619–3629
- Renikuntla BR, Rose HC, Eldo J, Waggoner AS, Armitage BA. *Org Lett*, 2004, 6: 909–912
- Kim SH, Hwang SH, Kim NK, Kim JW, Yoon CM, Keum SR. *Color Technol*, 2000, 116: 126–131
- Song B, Zhang Q, Ma WH, Peng XJ, Fu XM, Wang BS. *Dyes Pigments*, 2009, 82: 396–400
- Nanjunda R, Owens EA, Mickelson L, Alyabyev S, Kilpatrick N, Wang S, Henary M, Wilson WD. *Bioorg Med Chem*, 2012, 20: 7002–7011
- Miltsov S, Karavan V, Boyarsky V, Gómez-de Pedro S, Alonso-Chamarro J, Puyol M. *Tetrahedron Lett*, 2013, 54: 1202–1204
- Wycisk V, Pauli J, Welker P, Justies A, Resch-Genger U, Haag R, Licha K. *Bioconjugate Chem*, 2015, 26: 773–781
- 朱良漪. 分析仪器手册. 北京: 化学工业出版社, 1997
- 王丽. 生物荧光标识用菁染料的研究. 博士学位论文. 大连: 大连理工大学, 2010. 70–72
- 姜娜, 樊江莉, 杨洪宝, 彭孝军. 化工学报, 2016, 1: 176–190

Pentamethine cyanine located in mitochondria: relationship between photostability and excited state lifetime

Haiqiao Huang, Saran Long, Mingle Li, Jianjun Du, Jiangli Fan, Xiaojun Peng^{*}

State Key Laboratory of Fine Chemicals, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China

^{*}Corresponding author (email: pengxj@dlut.edu.cn)

Abstract: Pentamethine dyes are often used for near infrared fluorescent probes owing to the advantage of high sensitivity, however, their photostability is not so satisfying. In this paper, a series of pentamethine dyes which contain electron-donating groups like amino or hydroxyl groups were synthesized, and the effect of substituents on photostability and the application in cell imaging were also discussed. The results indicated that the photostability of fluorescent dyes which possess electron donors of amino and hydroxyl groups was high, and the lifetime of excited state of fluorescent probes were reduced after leading into the amino group proved by femtosecond transient absorption, respectively. Photostability is negatively correlated with the lifetime of the excited state and the fluorescent dyes are mainly localized in mitochondria of living cells. This research will be of importance for designing cyanine dyes with high photostability and good cellular stain properties.

Keywords: cyanine dye, photostability, lifetime of excited state, bioimaging, mitochondrial

doi: [10.1360/N032017-00061](https://doi.org/10.1360/N032017-00061)