一种基于萘酰亚胺的检测细胞内 pH 值的荧光探针及其生物成像应用

任江波^a 王蕾^b 郭锐^a 唐永和^a 周红梅^a 林伟英^{*,a,c}

(^a 广西大学 光功能材料与化学生物学研究院 化学化工学院 南宁 530004)

(^b 南宁市食品药品检验所 南宁 530007)

(^c 济南大学 光功能材料与成像研究院 化学化工学院 材料科学与工程学院 济南 250022)

摘要 细胞内溶酶体的 pH 值对细胞自噬、吞噬、酶加工等各项生命活动有着重要影响。细胞核是真核细胞中最大的细胞器,控制着生物体内的遗传和代谢过程,参与代谢过程的酶对 pH 值的变化很敏感。因此,研究细胞体内的 pH 值变化至关重要。我们设计并以简单的两步反应合成了一种新型荧光探针 **NpH-1**。该探针以萘酰亚胺作为荧光团,以吗啉基团作为对 pH 值响应的位点,通过光诱导电子转移(PET)机制调控荧光,能够对 pH 值变化响应。我们在缓冲范围为 1.81 到 11.92 的 Britton-Robison 缓冲液中测定了 **NpH-1** 对 pH 值变化响应的性质。在 pH 值 3.0 到 10.0 的范围内,**NpH-1** 能够对 pH 值的变化产生快速可逆的响应,其 pK_a 值为 5.41。探针具有很高的光稳定性。**NpH-1** 具有很低的细胞毒性,能够用于活细胞成像。我们用氯喹刺激 HeLa 细胞,使细胞的 pH 值发生变化,并用探针 **NpH-1** 监测了这一过程中的 pH 值变化。另外,还对 **NpH-1** 进行了溶酶体、线粒体、高尔基体、内质网和细胞核的共定位实验,结果表明,探针主要分布在溶酶体和细胞核中,这意味着 **NpH-1** 可以用于检测复杂细胞环境中的 pH 值变化。

关键词 溶酶体; 细胞核; pH; 萘酰亚胺; 荧光成像

A Naphthalimide-Based Fluorescent Probe for Detecting Intracellular pH and Its Biological Imaging Application

Ren, Jiangbo^a Wang, Lei^b Guo, Rui^a Tang, Yonghe^a Zhou, Hongmei^a Lin, Weiyong^{*,a,c}

(^a Institute of Optical Materials and Chemical Biology, School of Chemistry and Chemical Engineering, Guangxi University, Nanning 530004, China)

(^b Nanning Institute for Food and Drug Control, Nanning 530007, China)

(^c Institute of Fluorescent Probes for Biological Imaging, School of Chemistry and Chemical Engineering, School of Materials Science and Engineering, Jinan University, Jinan 250022, China)

Abstract The pH of lysosome in cells has significant affect to various biological activities, including autophagy, phagocytosis, enzyme processing and so on. The metastasis and apoptosis of cancer cells are closely related to change of the lysosomal pH. The nucleus is the largest organelle in eukaryotic cells which control the most important genetic and metabolic processes, and the enzymes involved in metabolic processes are sensitive to changes of pH. Therefore, it is very important to investigate the pH change in cells. Herein, we designed and synthesized a novel fluorescent probe **NpH-1** via a simple two-step reaction. The probe uses naphthalimide as the fluorescent group and morpholine group as the pH responsive site, and regulates the fluorescence through the photoinduced electron transfer (PET) mechanism. The spectroscopic properties of **NpH-1** response to pH changes were measured in the Britton-Robison buffers, whose buffering range was from 1.81 to 11.92. In the pH range from 3.0 to 10.0, **NpH-1** exhibited a very rapid and reversible response to pH change. The pK_a of **NpH-1** was 5.41. It showed a very high photostability. Moreover, the fluorescence emission of **NpH-1** was not influenced by biological species including metal ions, anions and amino acids. **NpH-1** showed very low cytotoxicity, which indicated that it could be applied for cell imaging. Thus, we monitored the pH changes in HeLa cells via stimulating them by Chloroquine. The cell imaging results showed that **NpH-1** could be utilized for detection of pH changes in living cells. Furthermore, the colocalization experiments of the probe **NpH-1** for various organelles including lysosome, mitochondria, Golgi, endoplasmic reticulum and cellular nucleus were carried out, and the results exhibited the probe **NpH-1** mainly distributed in lysosome and nucleus, which implied that the probe could be applied for detection of pH change in complex intracellular environment.

Keywords Lysosome; Cell nucleus; pH; Fluorescent imaging; Naphthalimide

* E-mail: weiyonglin@163.com; Tel.: +86-0771-3236493; Fax: +86-0771-3236493

Received August 31, 2020; published October 15, 2020.

Supporting information for this article is available free of charge via the Internet at <http://sioc-journal.cn>.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 21672083, 21877048, 22077048) and the Startup Fund of Guangxi University (No. A3040051003).

项目受国家自然科学基金(Nos. 21672083, 21877048, 22077048)和广西大学启动基金(No. A3040051003)资助。

1 引言

细胞内的酸碱平衡在许多细胞活动中具有重要作用^[1-3],是细胞凋亡、增殖和酶活性等生物过程中非常关键的因素^[4-5]。自噬是溶酶体降解清除功能异常或受损的细胞器的过程^[6-8],溶酶体在这一过程中发挥了重要作用^[9-10],这一过程中溶酶体内 pH 会发生变化;另一方面不正常的溶酶体 pH 会导致如休克、癌症和类风湿性关节炎密切相关的功能障碍疾病^[11-13],因此,检测溶酶体内 pH 值的变化,对于理解细胞内的生理或病理过程具有重要意义。

细胞核是遗传信息的储存场所^[14],同时也是细胞遗传和代谢的调控中心,它直接或间接的参与了细胞遗传和代谢活动密切相关的基因复制和转录等过程^[15]。细胞核具有弱碱性的微环境,细胞核中有丝分裂的不同时期细胞核具有不同的 pH 值。pH 值的变化则会影响到细胞核内酶的活性以及细胞正常的生理过程。所以准确检测细胞核内的 pH 值变化对了解遗传物质的传递有重要意义。目前检测细胞核 pH 值的探针报道较少。

传统的 pH 值检测方法包括酸碱指示剂滴定法和电位滴定法和电化学测量法等^[16]。荧光成像具有高灵敏度,实时检测以及对生物样品破坏小等优点而成为一种极具吸引力的检测生物分子的技术^[17-21]。因此,检测溶酶体内的 pH 值变化对于理解细胞内各种的生物过程具有重要的意义。

到目前为止,有文献已经报道了一些检测细胞内 pH 变化的探针及其光学性质^[22-32],2016 年上官隽华课题组报告了一种花青染料具有红色荧光发射,可同时探测线粒体和自溶酶体,成功应用于自噬的可视化^[33]。但其复杂的合成工艺和容易变化的花菁光漂白染料可能会限制其实际应用。本文基于光致电子转移(PET)原理,设计了一种基于 1,8-萘酰亚胺染料的 pH 值探针 **NpH-1**,该探针以吗啉基团作为对 pH 响应的基团来调控探针在不同 pH 值条件下的荧光(Scheme 1)。并尝试将该探针应用于检测细胞内的 pH 值变化。

图式 1 探针 **NpH-1** 对 pH 值变化的响应机理
Scheme 1 The mechanism of the probe **NpH-1** response to pH

2 结果与讨论

2.1 探针 **NpH-1** 的合成

如图 2 所示,探针 **NpH-1** 的合成经过了两步有机合成,详细实验过程与表征数据见实验部分。

图式 2 探针 **NpH-1** 的合成路线
Scheme 2 The synthesis of the probe **NpH-1**

2.2 探针 **NpH-1** 的光谱性质2.2.1 探针 **NpH-1** 的紫外-可见吸收光谱

首先,测定探针 **NpH-1** 在 pH 3.0~10.0 范围内的吸收光谱。如图 1 所示,探针的吸收光谱在 450 nm 左右有一个吸收峰,虽然随着 pH 值的不同峰值有所偏移,但整体来说偏移范围不大,不影响后续发射光谱的测试。且由于在 pH 值为 7.4 时(人体内正常 pH 值),其最大吸收峰在 440 nm 处,故选取 440 nm 作为后续探针荧光发射检测的激发波长。

图 1 探针 **NpH-1** (10 $\mu\text{mol/L}$) 在 B-R 缓冲液中的紫外-可见吸收光谱 (pH 值范围 3.0~10.0)

Figure 1 The UV-Vis absorption spectra of the probe **NpH-1** (10 $\mu\text{mol/L}$) in PBS buffers (pH range of 3.0~10.0).

2.2.2 探针 **NpH-1** 的荧光光谱

接下来,测试了探针 **NpH-1** 在 3.0~10.0 的 pH 值的范围内的荧光光谱,如图 2 所示,随着 pH 值的逐渐增加,探针在 540 nm 处的荧光强度逐渐下降。这是因为在酸性条件下,探针吗啉基团上的 N 原子被质子化,因此探针从吗啉基团到 1,8-萘酰亚胺染料的 PET 过程受到抑制,探针荧光增强;而随着 pH 值的逐渐升高,在碱性条件下,探针吗啉基团上的 N 原子去质子化,发生从 N 原

(a)

(b)

图2 (a) 探针 **NpH-1** (10 $\mu\text{mol/L}$) 在 3.0~10.0 的 pH 值范围内的荧光发射光谱; (b) 探针 **NpH-1** (10 $\mu\text{mol/L}$) 在 3.0~10.0 的 pH 值范围内 540 nm 处荧光强度 ($\lambda_{\text{ex}}=440\text{ nm}$)

Figure 2 (a) The emission spectra of the probe **NpH-1** at 540 nm in pH range of 3.0~10.0; (b) the pH titration of the probe **NpH-1**. ($\lambda_{\text{ex}}=440\text{ nm}$)

子上的孤对电子到 1,8-萘酰亚胺染料上的 PET 过程, 因此, 探针 **NpH-1** 的荧光逐渐减弱. pH 值越高, PET 效应越强. 通过对不同 pH 值的缓冲体系进行荧光滴定, 得到探针的 pK_a 值为 5.41. 因此, 探针 **NpH-1** 能够监测 pH 值的变化.

为了验证探针是否在不同 pH 值下是否稳定, 我们分别测定了 pH 值分别为 4.0, 7.4 和 9.0 时探针的光稳定性. 如图 3 所示, 探针 **NpH-1** 在同一 pH 值条件下, 有光照和无光照探针 **NpH-1** 的荧光发射强度没有太大差别, 这证明探针 **NpH-1** 具有良好的光稳定性.

由于细胞内环境的而复杂性, 细胞内 pH 值的变化处于动态的平衡状态, 探针的可逆性对于实时监测细胞内 pH 值的变化非常重要. 探针 **NpH-1** 能够通过吗啉基团上 N 原子的质子化和去质子化来调控探针的 PET 过程, 从而调控探针的荧光变化, 因此, 探针 **NpH-1** 对 pH 值变化的响应应该是可逆的. 为了验证这一点, 我们利用 pH 值为 4.0 和 8.0 的体系对探针进行了滴定实验, 如图 4 所示, 当 pH 值为 4.0 时, 探针 **NpH-1** 显示出很强的黄色荧光, 当 pH 值变为 8.0 时, 探针的荧光发射减弱,

图3 探针 **NpH-1** (10 $\mu\text{mol/L}$) 在 pH 值为 4.0, 7.4 和 9.0 时有无光照条件下的荧光强度随时间的变化曲线 ($\lambda_{\text{ex}}=440\text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}=540\text{ nm}$)

Figure 3 The curve of fluorescent emission intensity variation with time of the probe **NpH-1** (10 $\mu\text{mol/L}$) at pH 4.0, 7.4 and 9.0. ($\lambda_{\text{ex}}=440\text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}=540\text{ nm}$)

图4 探针 **NpH-1** (10 $\mu\text{mol/L}$) 在 pH 为 4.0 和 8.0 之间的可逆循环 ($\lambda_{\text{ex}}=440\text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}=540\text{ nm}$)

Figure 4 The reversible cycle of the fluorescent emission of the probe the probe **NpH-1** (10 $\mu\text{mol/L}$) between pH 4.0 and 8.0.

而当 pH 值恢复到 4.0 时, 探针 **NpH-1** 的黄色荧光也得到恢复, 循环 6 次之后, 从图中可以看探针的荧光仍然能够恢复. 以上结果表明探针 **NpH-1** 对 pH 值变化的响应具有很好的可逆性.

为了检测生物体内的离子、氨基酸、活性氧等生物体内的各类离子和分子是否会影响探针 **NpH-1** 对 pH 值变化的响应, 我们进行了干扰实验. 在 pH 值为 4.0 和 7.4 的溶液中, 分别加入 200 $\mu\text{mol/L}$ 的干扰离子或各类离子或分子, 测定探针 **NpH-1** 的荧光发射. 如图 5 所示, 加入各类干扰离子或分子后探针 **NpH-1** 在 pH 值 4.0 和 7.0 时的荧光发射几乎不变, 因此, 探针 **NpH-1** 对 pH 值变化的响应不受其他离子或分子的干扰, 能够检测生物体内的 pH 值变化.

2.3 探针 **NpH-1** 的细胞成像实验

2.3.1 细胞毒性实验

探针的细胞毒性会影响探针在生物体系内的应用. 因此, 我们首先进行了细胞毒性测试. 利用甲基噻唑

图 5 探针 **NpH-1** (10 $\mu\text{mol/L}$) 在各种离子和分子 (200 $\mu\text{mol/L}$) 在 pH 为 4.0 和 7.4 的溶液中在 540 nm 处的荧光发射强度。1. α -D-葡萄糖; 2. L-苯丙氨酸; 3. L-丙氨酸; 4. L-蛋氨酸; 5. L-精氨酸; 6. L-抗坏血酸; 7. L-亮氨酸; 8. L-脯氨酸; 9. L-色氨酸; 10. L-丝氨酸; 11. L-天冬氨酸; 12. L-缬氨酸; 13. L-异亮氨酸; 14. L-组氨酸; 15. 丙酮醛; 16. 醋酸钠; 17. 二氯化钴; 18. 氟化钠; 19. 甘氨酸; 20. 硫氰化钠; 21. 硫酸钠; 22. 氯化钾; 23. 二氯化锰; 24. 氯化钠; 25. 碳酸钠; 26. 碳酸氢钠; 27. 无水氯化镁; 28. 五水合硫代硫酸钠; 29. 五水合硫酸铜; 30. 亚硫酸钠; 31. 亚硝酸钠。

基四唑(MTT)法测定了 **NpH-1** 浓度分别为 1 $\mu\text{mol/L}$, 2 $\mu\text{mol/L}$, 5 $\mu\text{mol/L}$, 10 $\mu\text{mol/L}$, 20 $\mu\text{mol/L}$ 和 30 $\mu\text{mol/L}$ 时的细胞毒性。经过 24 h, 仍然有超过 80% 的细胞存活, 这说明探针 **NpH-1** 的细胞毒性很小, 能够用于细胞成像实验(图 S1)。

氯喹是一种抗疟疾药物, 能够引起溶酶体 pH 值的改变^[34]。我们利用氯喹来刺激 HeLa 细胞, 来观测探针 **NpH-1** 对 pH 值变化的响应情况。如图 6 所示, 只用探针 **NpH-1** 处理后的 HeLa 细胞几乎没有荧光; 而用氯喹刺激细胞后再加探针 **NpH-1**, 能够观测到很强的绿色荧光。以上结果表明, 探针 **NpH-1** 能够用于检测细胞内的 pH 值变化。

为了研究探针 **NpH-1** 在细胞中的分布情况, 我们分别用线粒体定位染料(MitoTrackerTM Deep Red)、溶酶体定位染料(LysoTrackerTM Deep Red)、细胞核定位染料(Hoechst 33342)、高尔基体定位染料(Golgi-Tracker Red)和内质网蓝色定位染料(ER-Tracker Blue)来与探针进行共定位实验, 实验结果表明, 探针在细胞内主要分布在溶酶体和细胞核中(图 7 和表 S1)。因此, 探针可以用于检测溶酶体和细胞核内的 pH 值变化。

图 6 (a~c) HeLa 细胞用探针 **NpH-1** (10 $\mu\text{mol/L}$) 处理后的细胞成像图; (d~f) HeLa 细胞用氯喹 (10 $\mu\text{mol/L}$) 处理 30 min 后加入探针 **NpH-1** (10 $\mu\text{mol/L}$) 的细胞成像图

Figure 6 (a~c) The imaging photograph of HeLa cell treated with the probe **NpH-1** (10 $\mu\text{mol/L}$); (d~f) the imaging photograph of HeLa cell treated with chloroquine (10 $\mu\text{mol/L}$) for 30 min then addition of the probe **NpH-1** (10 $\mu\text{mol/L}$).

图 7 (a1)~(a4) 探针 **NpH-1** (10 $\mu\text{mol/L}$) 与 Hoechst 33342 (10 $\mu\text{mol/L}$) 的共定位成像图; (b1)~(b4) 探针 **NpH-1** (10 $\mu\text{mol/L}$) 与 MitoTrackerTM Deep Red (10 $\mu\text{mol/L}$) 的共定位成像图; (c1)~(c4) 探针 **NpH-1** (10 $\mu\text{mol/L}$) 与 LysoTrackerTM Deep Red (10 $\mu\text{mol/L}$) 的共定位成像图; (d1)~(d4) 探针 **NpH-1** (10 $\mu\text{mol/L}$) 与 Golgi-Tracker Red (10 $\mu\text{mol/L}$) 的共定位成像图; (e1)~(e4) 探针 **NpH-1** (10 $\mu\text{mol/L}$) 与 ER-Tracker Blue (10 $\mu\text{mol/L}$) 的共定位成像图。

Figure 7 (a1)~(a4) The colocalization photograph of the probe **NpH-1** (10 $\mu\text{mol/L}$) with Hoechst 33342 (10 $\mu\text{mol/L}$); (b1)~(b4) The colocalization photograph of the probe **NpH-1** (10 $\mu\text{mol/L}$) with MitoTrackerTM Deep Red (10 $\mu\text{mol/L}$); (c1)~(c4) The colocalization photograph of the probe **NpH-1** (10 $\mu\text{mol/L}$) with LysoTrackerTM Deep Red; (d1)~(d4) The colocalization photograph of the probe **NpH-1** (10 $\mu\text{mol/L}$) with Golgi-Tracker Red; (e1)~(e4) The colocalization photograph of the probe **NpH-1** (10 $\mu\text{mol/L}$) with ER-Tracker Blue.

3 结论

本文设计并合成了主要分布在溶酶体和细胞核的 pH 值探针 **NpH-1**。该探针具有很高的灵敏度和光稳定

性, 对 pH 值的变化具有快速可逆的响应, 具有很低的细胞毒性. 当 pH 从 10.0 降低到 3.0 时, 探针荧光发射明显增强. 该探针的 pKa 为 5.41, 对于研究酸性细胞器的内环境有很大的意义. 探针 **NpH-1** 的细胞成像和共定位实验显示, 探针进入细胞后主要分布在溶酶体和细胞核, 这对于研究各种生理病理过程在溶酶体和细胞核内的 pH 值变化具有潜在的应用价值.

4 实验部分

4.1 仪器与试剂

本研究中所有化学试剂与生物试剂均为市售产品, 属化学纯或分析纯, 除特别说明外, 无需进一步纯化即可使用. 实验中使用的蒸馏水是已购仪器自己产生, 未被污染可放心使用. 薄层色谱(TLC)分析在硅胶板上进行, 组层析使用硅胶(筛网 200~300 目). 使用 Bruker APEX IV-FTMS 7.0 T 质谱仪获得了探针的高分辨率质谱(HRMS). 使用四甲基硅烷(TMS)作为内部参考, 使用 500 MHz 及 600 MHz 核磁共振仪作 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 数据图. 使用 pH 计进行 pH 值的测量. 用岛津 UV-2700 分光光度计测量紫外-可见吸收光谱. 用日立 F-4700 荧光分光光度计记录荧光发射光谱. 数据表示为三个独立测量的平均标准偏差(SD). 细胞活力测定在多功能酶标仪(Thermo Fisher, MA, USA)上进行. 细胞荧光图像在徕卡 TCS-SP8 DIVE 共聚焦显微镜上获得.

4.2 探针合成

4.2.1 化合物 2 的合成

在 100 mL 圆底烧瓶中将 4-溴-1,8-萘二甲酸酐(0.554 g, 2 mmol)与 4-二甲基氨基苯胺(300 mg, 2 mmol)混合, 再向其中加入 20 mL 乙醇, 加热回流搅拌 5 h, 反应液冷却至室温后抽滤并使用乙醇润洗干净, 干燥后通过柱层析纯化($V_{\text{二氯甲烷}}/V_{\text{甲醇}}=5/1$), 得到淡黄色固体(585 mg, 产率 70%). ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 8.62 (dd, $J=8.5, 1.1$ Hz, 1H), 8.59 (dd, $J=7.3, 1.1$ Hz, 1H), 8.35 (d, $J=7.8$ Hz, 1H), 8.27 (d, $J=7.9$ Hz, 1H), 8.05 (dd, $J=8.5, 7.3$ Hz, 1H), 7.46~7.41 (m, 2H), 7.36~7.31 (m, 2H), 3.51 (s, 2H), 2.23 (s, 6H).

4.2.2 探针 **NpH-1** 的合成

将化合物 2(0.408 g, 1 mmol)溶于 10 mL 乙二醇单甲醚中, 置于 125 $^\circ\text{C}$ 回流, 待化合物 2 完全溶解后, 然后向其中滴加 2-(乙二氨基)吗啉(0.130 g, 1 mmol)搅拌回流 12 h. 反应液冷却至室温后, 减压蒸馏除去溶剂, 使用柱层析纯化($V_{\text{二氯甲烷}}/V_{\text{甲醇}}=20/1$), 得到黄色固体 **NpH-1**(0.320 g, 产率 51.8%). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8.70 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 8.43 (d, $J=7.1$ Hz, 1H), 8.26 (d, $J=8.5$ Hz, 1H), 7.72 (s, 1H), 7.41 (d, $J=8.1$ Hz, 2H), 7.29~7.21 (m, 2H), 6.85 (d, $J=8.6$ Hz, 1H), 3.61 (t, $J=4.6$ Hz, 5H), 3.51 (s, 2H), 2.68 (t, $J=6.8$ Hz,

2H), 2.51 (dq, $J=6.5, 4.5, 3.2$ Hz, 7H), 2.24 (s, 7H); ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO) δ 164.46, 163.61, 151.08, 138.63, 135.69, 134.73, 131.25, 130.32, 129.47, 129.40, 129.09, 124.83, 122.77, 120.68, 108.44, 104.40, 66.69, 63.29, 56.64, 53.85, 45.37; HRMS(ESI) $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_3$ 459.2391, found 459.2388.

4.3 计算方法

荧光量子产率计算方法如下: 量子产率 $\Phi_x=\Phi_s(n_x/n_s)^2(A_s/A_x)(F_x/F_s)$ 或 $\Phi_x=\Phi_s(A_s/A_x)(F_x/F_s)$ 式中 Φ 为荧光量子效率; x 表示测试样品; s 表示标准物质; n 表示溶剂的折射率(一般溶剂之间的折射率相差较少, 可省去); A 该激发波长的入射光的吸光度($A=\epsilon bc$); F 表示荧光强度或者发射光谱的积分面积. 运用此公式时一般要求吸光度 A 低于 0.05. 参比标准样最好选择其激发波长值相同或相近的荧光物质. 有分析应用价值的荧光化合物的 Φ 一般常在 0.1~1 之间.

pKa 计算方法如下: 计算公式是 $\lg[\text{HA}]/[\text{A}^-]=\text{pKa}-\text{pH}$, 根据化合物浓度与荧光强度的关系, 则有: $\text{pH}-\text{pKa}=\lg(F_{\text{max}}-F)/(F-F_{\text{min}})$. 式中 F_{max} 和 F_{min} 分别为在一系列 pH 值体系中测得的荧光强度的最大值(滴定达饱和时的荧光强度)和最小值(背景荧光强度).

4.4 光谱分析

探针母液的配制: 称取一定量的纯品探针, 溶于 4 mL DMSO 中, 配制成 1 mmol/L 探针母液. 然后每次取相应体积的探针母液, 配成 10 $\mu\text{mol/L}$ 的探针测试液即可.

B-R 缓冲液的配制: 将 0.04 mol/L 硼酸、磷酸(85%)以及醋酸混合而成, 使用时利用 0.2 mol/L 氢氧化钠溶液加入不同体积调节到所需 pH 值即可.

紫外-可见吸收光谱测试方法是先取不同 pH 的溶液, 向其中加入相应的 DMSO, 形成和探针测试液相同浓度的空白组, 然后使用空白组扫完基线后, 再将探针测试液换上进行测试, 最终得到紫外-可见吸收光谱图.

荧光光谱测试方法是按照不同谱图所需要的溶液情况, 配制相应的测试液, 具体细节已在光谱测试前的说明中提出, 这里不再赘述. 测试条件是电压为 500 V, 狭缝宽度为 5 nm, 入射波长 440 nm, 最大发射波长是 540 nm.

4.5 细胞培养和 MTT 分析

HeLa 细胞购自 Key Gen Biotech (Nanjing, China). 细胞培养于添加了 10%胎牛血清、80 U/mL 青霉素和 0.08 mg/mL 链霉素的 Minimum Essential Medium (MEM) 中, 在 $\phi(\text{CO}_2)=5\%$ 的培养箱中, 37 $^\circ\text{C}$ 下培养 24 h.

pH 探针的细胞毒性测定采用 MTT 法. 选用细胞密度在 90%以上的细胞培养基, 先吸走原培养液, 加入磷酸缓冲盐溶液(PBS)清洗一次, 再加入 500 μL 0.25%的胰酶, 培养 1~2 min 使细胞酶解, 加入 1 mL Dulbecco's

Modified Eagle Medium(DMEM)吹散, 使用离心仪器离心 3 min 将细胞沉降在离心管底部, 吸走上层清液, 加入 7 mL DMEM 吹散均匀, 然后按要求加入到 96 孔板中, 外围孔板加入 100 μ L PBS, 其余的加入 100 μ L 上述液体, 在 $\varphi(\text{CO}_2)=5\%$ 培养箱中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 下培养过夜. 将不同浓度的 pH 探针(1, 2, 5, 10, 20, 30 $\mu\text{mol/L}$)加入到细胞中继续培养 24 h, 小心吸走培养液, 然后将 MTT 使用 PBS 溶解形成相应浓度后, 每孔取 10 μ L 加入含 90 μ L 新培养液的培养基继续孵育 4 h. 小心地去除培养液, 再每孔加入 100 μ L 二甲基亚砷并摇 10 min 以完全溶解. 最后用多功能酶标仪(Thermo Fisher, MA, USA)测定 492 nm 处的吸光值, 处理数据计算得到细胞存活率.

4.6 成像实验

将 HeLa 细胞孵育 24 h, 同时将探针配制形成 1 mmol/L 的母液, 向不同的细胞培养皿中加入实验所需的量, 形成相应的探针浓度, 进行实验(实验需求见结果与讨论中的成像测试), 成像前若无特别要求, 加入探针孵育后需要先使用 PBS 清洗两到三次, 再使用共聚焦荧光显微镜进行成像.

References

- [1] Xu, K.; Klivanov A. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*(1), 9815.
- [2] Tian H.; Gan J.; Chen K.; He J.; Song Q.L.; Hou X. Y. *J. Mater. Chem.* **2002**, *12*(5), 1262.
- [3] Burleigh S. C.; van de Laar T.; Stroop C. J.; van Grunsven W. M.; O'Donoghue N.; Rudd P. M.; Davey G. P. *BMC Biotechnol.* **2011**, *11*(1), 95.
- [4] Zhou X.; Su F.; Lu H.; Senechal-Willis P.; Tian Y.; Johnson R. H.; Meldrum D. R. *Biomaterials* **2012**, *33*(1), 171.
- [5] Luzio J. P.; Pryor P. R.; Bright N. A. *Nat. Rev. Mol. Cell Bio.* **2007**, *8*(8), 622.
- [6] Reinheckel T.; Deussing J.; Roth W.; Peters C. *Biol. Chem.* **2001**, *382*(5), 735.
- [7] Watts C. *Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteomics* **2012**, *1824*(1), 14.
- [8] Zhao H. *Traffic* **2012**, *13*(10), 1307.
- [9] Mohamed M. M.; Sloane B. F. *Nat. Rev. Cancer* **2006**, *6*(10), 764.
- [10] Groth-Pedersen L.; Jaattela M. *Cancer Lett.* **2013**, *332*(2), 265.
- [11] Cirman T.; Oresic K.; Mazovec G. D.; Turk V.; Reed J. C.; Myers R. M.; Salvesen G. S.; Turk B. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*(5), 3578.
- [12] Hesse S. J. A.; Ruijter G. J. G.; Dijkema C.; Visser J. *J. Biotechnol.* **2000**, *77*(1), 5.
- [13] Schartner E. P.; Henderson M. R.; Purdey M.; Dhatrak D.; Monro T. M.; Gill P. G.; Callen D. F. *Cancer Res.* **2016**, *76*(23), 6795.
- [14] Newport J. W.; Forbes D. J. *Annu. Rev. Biochem.* **1987**, *56*(1), 535.
- [15] Shen W. H.; Balajee A. S.; Wang J.; Wu H.; Eng C.; Pandolfi P. P.; Yin Y. *Cell* **2007**, *128*(1), 157.
- [16] Zhou C. M.S. Thesis, Liaoning University, Shen-yang, **2013** (in Chinese). (周超, 硕士论文, 辽宁大学, 沈阳, **2013**.)
- [17] Singha S.; Kim D.; Seo H.; Cho S.W.; Ahn K. H. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*(13), 4367.
- [18] Li X.; Gao X.; Shi W.; Ma H. *Chem. Rev.* **2014**, *114*(1), 590.
- [19] Lv H.; Yang X.F.; Zhong Y.; Guo Y.; Li Z.; Li H. *Anal. Chem.* **2014**, *86*(3), 1800.
- [20] Carter K. P.; Young A. M.; Palmer A. E. *Chem. Rev.* **2014**, *114*(8), 4564.
- [21] Li L.; Li P.; Fang J.; Li Q.; Xiao H.; Zhou H.; Tang B. *Anal. Chem.* **2015**, *87*(12), 6057.
- [22] Sun R.; Liu W.; Xu Y.; Lu J.; Ge J.; Ihara M. *Chem. Commun.* **2013**, *49*(91), 10709.
- [23] Zhang Y.; Fang H.; Zhang X.; Wang S.; Xing G. *ChemistrySelect* **2016**, *1*(1), 1.
- [24] Wang, X. L.; Li, X. J.; Sun, R.; Xu, Y.J.; Ge J. F. *Analyst.* **2016**, *141*(10), 2962.
- [25] Song G. J.; Bai S.Y.; Luo J.; Cao X. Q.; Zhao B. X. *J. Fluoresc.* **2016**, *26*(6), 2079.
- [26] Zhang S.; Chen T.; Lee H.; Bi J.; Ghosh A.; Fang M.; Qian Z.; Xie F.; Ainsley J.; Christov C.; Luo F.; Zhao F.; Liu H. *ACS Sensors* **2017**, *2*(7), 924.
- [27] Zhang, Y.; Wang, Z.-L.; Tao, Y.; Xu, X.; Fang, H.; Wang, S.-F. *Chin. J. Org. Chem.* **2018**, *38*(10), 2693 (in Chinese). (张燕, 王忠龙, 陶钰, 徐徐, 方华, 王石发, 有机化学, **2018**, *38*(10), 2693.)
- [28] Xiang, D.-C.; Liu, H.; Meng, Q.-H.; Lan, M.-B.; Wei, G. *Acta Chim. Sinica* **2013**, *71*(10), 1435 (in Chinese). (向德成, 刘恒, 孟庆华, 蓝闽波, 卫钢, 化学学报, **2013**, *71*(10), 1435.)
- [29] Wu, P.-Q.; Liang, C.-H. *Int. J. Med. Radiol.* **2016**, *39*(04), 410 (in Chinese). (吴佩琪, 梁长虹. 国际医学放射学杂志, **2016**, *39*(04), 410)
- [30] Guan, X.-L.; Li, Z.-F.; Wang, L.; Liu, M.-N.; Wang, K.-L.; Yang, X.-Q.; Li, Y.-L.; Hu, L.-L.; Zhao, X.-L.; Lai, S.-J.; Lei, Z.-Q. *Acta Chim. Sinica* **2019**, *77*(12), 1268 (in Chinese). (关晓琳, 李志飞, 王林, 刘美娜, 王凯龙, 杨学琴, 李亚丽, 胡丽丽, 赵小龙, 来守军, 雷自强, 化学学报, **2019**, *77*(12), 1268.)
- [31] Ma, Y.; Chen, K.-X.; Guo, Z.-L.; Liu, S.-J.; Zhao, Q.; Huang, W.-Y. *Acta Chim. Sinica* **2020**, *78*(01), 23 (in Chinese). (马云, 陈可欣, 郭则灵, 刘淑娟, 赵强, 黄维扬, 化学学报, **2020**, *78*(01), 23.)
- [32] Li, Y.; Zhan, H.; Li, M. *New Chem. Mater.* **2019**, *47*(08), 135 (in Chinese). (李阳, 张辉, 李明, 化工新型材料, **2019**, *47*(08), 135)
- [33] Liu Y.; Zhou J.; Wang L.; Hu X.; Liu X.; Liu M.; Cao Z.; Shanguan D.; Tan W. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*(38), 12368.
- [34] Cao, X.-J.; Chen, L.-N.; Zhang, X.; Liu, J.-T.; Chen, M.-Y.; Wu, Q.-R.; Miao, J.-Y.; Zhao, B.-X. *Anal. Chim. Acta* **2016**, *920*, 86.

(Yang, X.)