

基于激发态能量转移机理比率型荧光探针的研究进展

陈忠林^a 李红玲^a 韦 驾^a 肖 义^b 于海波^{*,a}^(a) 辽宁大学环境学院 沈阳 110036^(b) 大连理工大学 精细化工国家重点实验室 大连 116024

摘要 激发态能量转移(Excitation Energy Transfer, EET)作为一类重要的光物理现象,被广泛用于比率型荧光探针和分子灯标的设计以及 DNA 检测等多个领域.影响 EET 效率的两个重要因素是供受体间的空间距离和光谱交盖,通过调节供受体间的空间距离或光谱重叠程度来调控能量转移过程,实现对目标客体的双波长比率检测.综述了基于不同供受体荧光团的 EET 体系、供受体间的连接方式对能量转移效率的影响,以及通过调控供受体间光谱重叠程度或空间距离,获得识别不同客体的比率型荧光探针,并对 EET 机理的比率型荧光探针的设计以及未来在生物成像和医学检测等领域的应用进行了展望.

关键词 荧光探针;激发态能量转移;Förster 能量转移;比率型荧光探针;荧光发色团

Recent Progress in Ratiometric Fluorescent Probes Based on Excitation Energy Transfer Mechanism

Chen, Zhonglin^a Li, Hongling^a Wei, Jia^a Xiao, Yi^b Yu, Haibo^{*,a}^(a) College of Environmental Sciences, Liaoning University, Shenyang 110036^(b) State Key Laboratory of Fine Chemicals, Dalian University of Technology, Dalian 116024

Abstract Excitation energy transfer (EET) is one of the vital photophysical phenomena, which is widely used in many applications, such as the design of ratiometric fluorescent probes, molecular beacon, DNA analysis, and so on. The process of energy transfer from donor to acceptor can be regulated by two factors: the spatial distance between donor and acceptor, and the spectral overlaps between donor emission and acceptor absorption, which results that there is a wide variety in the ratio at two different wavelengths of ratiometric fluorescent probes. In this review, noticeable EET systems with different donor fluorophore, connection form and energy transfer efficiency between donor and acceptor, and the modulation of spatial distance or spectral overlap are summarized. Finally, as a promising tool, the future developing prospects of EET fluorescent probes in bioimaging and medical diagnostics are discussed and highlighted.

Keywords fluorescent probe; excitation energy transfer; Förster resonance energy transfer; ratiometric probe; fluorophore

随着荧光显微成像技术和时间分辨技术的迅速发展,基于超分子化学和有机染料的荧光探针现已成为研究生物学和医学领域相关问题的重要工具.荧光探针在与目标客体相互作用过程中荧光信号会发生改变,借助于荧光信号的变化,荧光探针能够对目标客体进行实时在线的检测或监测,并被广泛用于分析化学、生物化学、医学和环境监测等多个领域^[1].荧光探针主要有 3 种类型:淬灭型、增强型和比率型.由于增强型荧光探针在与目标客体作用后,荧光输出信号增强,在荧光显微成

像中比淬灭型荧光探针更为灵敏,故增强型荧光探针是目前荧光探针领域设计的主流^[2].

与增强型荧光探针相比,比率型荧光探针在定量检测方面具有明显的优势,近些年来,比率型荧光探针的设计是目前荧光探针领域研究的热点之一^[3~7].比率型荧光探针具有双波长发射(或激发)的特征,该波长比率值的变化独立于探针浓度和光源强度,其中最突出的特征在于其光谱形状及比率的变化值与检测客体的浓度一一对应,从而为定量检测客体分子提供依据.自

* E-mail: yuhaibo@lnu.edu.cn

Received September 23, 2014; revised November 18, 2014; published online December 2, 2014.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 21302080), and the Program Funded by Liaoning Province Education Administration (No. L2014010).

国家自然科学基金(No. 21302080)、辽宁省教育厅科研(No. L2014010)资助项目.

Tsien 等^[8,9]于 1985 年首次设计了钙离子比率型荧光探针 Fura-Ca 以来, 分子内电荷转移(Intermolecular Charge Transfer, ICT)机制便成为设计比率型荧光探针的主要机理之一^[10]. 除了 ICT 机制外, 近些年来出现了多种比率型荧光探针设计机理和设计模式, 其中较为出色的是利用激发态能量转移(Excitation Energy Transfer, EET)^[11~14]机制来设计新型的比率型荧光探针. 关于 EET 机制和比率型荧光探针, 前人已作了详细的介绍, 其中 Speiser^[15]和 Peng 等^[16]分别对 EET 机理和比率型荧光探针的设计进行了总结. 与 ICT 机制的比率型探针相比, EET 型比率荧光探针具有明显的优势: (1)激发波长单一, 双发射峰重叠少, 比率值变化更加明显. 受自身机制的限制, ICT 型比率探针的双发射光谱存在较大重叠, 比率值变化不明显并且在很大程度上会受到仪器灵敏度的限制, 尤其是在荧光显微成像中, 这一问题尤为突出; (2)比率值的变化不受溶剂极性等因素的干扰, EET 体系中的荧光光谱取决于各自的荧光团, 合理选择荧光团可以使其光谱不受“溶剂化效应”的影响, 即比率值的变化不受微环境极性的影响, 而仅仅与检测客体浓度相关. 众所周知, ICT 型比率荧光探针的荧光团均为分子内电荷转移体系, 溶剂化效应是其自身难以克服的固有缺陷. EET 机理能够克服上述 ICT 机理在设计比率型荧光探针方面的不足, 具有广阔的前景. 为了使科研工作者更好地了解 EET 比率型荧光探针的设计和构建模式, 本文主要对近年来 EET 比率型荧光探针的研究进展进行总结, 以期望研发出更多新颖的比率型荧光探针.

1 激发态能量转移

随着能量转移理论研究的不断深入, 人们对能量转移过程有了更深的了解, 设计合成了多种类型的 EET 体系^[17,18]. 能量转移体系的分类方法不尽相同, 依据能量传递的方式可以分为跨空间能量转移(Through-Space Energy Transfer, TSET)和跨键能量转移(Through-Bond Energy Transfer, TBET)^[15,19].

1.1 跨空间能量转移

跨空间能量转移机理由 Förster (1910~1974)于 1946 年首次提出. TSET 体系是指两个不同的荧光团分别作为供体 donor 和受体 acceptor, 其中供体的发射光谱与受体的吸收光谱有一定程度的重叠, 当两个荧光团相互靠近时(一般小于 100 Å), 可观察到能量由供体向受体转移的现象, 即当激发供体时, 能量由供体转移至受体, 从而最终观测到受体以辐射(荧光)或非辐射的形式将能量释放出去^[20,21], 如图 1a 所示. TSET 体系中供受体通过柔性链相互连接, 该类型也称为 Förster

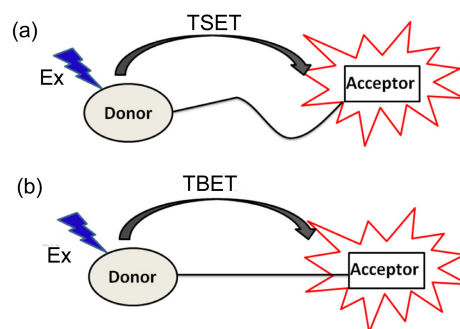


图 1 跨空间型(a)和跨键型能量(b)转移体系示意图

Figure 1 EET model of systems through-space (a) or through-bond (b)

能量转移体系(Förster Resonance Energy Transfer, FRET).

由于 TSET 体系中供受体间的连接方式采用柔性链连接, 供体与受体间的空间取向(取向因子 k^2)会发生变化, 取向因子 k^2 的大小取决于供受体偶极跃迁的空间取向, 通常其数值介于 0~4 之间, 该数值的变化会直接影响对 Förster 半径的 R_0 的估算, 如公式 1 所示^[22], 最终会影响能量转移效率的计算. 取向因子 k^2 的影响在均一的溶液中并不显著, 这是因为在均一的溶液中供受体间保持了较为稳定的空间距离和空间取向. 当采用 TSET 体系作为分子标尺测量生物大分子的空间距离时, 方向因子的影响就较为凸显, 这是由于供受体的空间取向会受到微环境中其他生物大分子的干扰.

$$R_0 = 0.21 [k^2 n^4 \Phi_D \int_0^\infty I_D(\lambda) \epsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda]^{1/6} \quad (1)$$

式中 k^2 表示偶极取向因子, 能量供体与受体间的相互取向无规则时, 因子 $k^2=2/3$; Φ_D 是供体的量子效率; n 是溶剂因子; $I_D(\lambda)$ 是供体的归一化荧光光谱; $\epsilon_A(\lambda)$ 是受体的摩尔消光系数.

该理论指出能量既可以在分子内的不同荧光团间转移, 也可以在不同分子间发生转移, 通过改变供受体间的空间距离可以有效地调控供受体间的能量转移过程. 常见的 TSET 体系多为两个发色团结构, 近些年来也出现了多发色团的能量转移体系, 例如 Zissel^[17]和 Xiao 等^[18]分别报道了基于氟硼吡咯(BODIPY)为母体的三荧光团 EET 体系, 多发色团的能量转移体系将会在光捕集系统、光电材料等领域发挥重要作用.

1.2 跨键能量转移

除了 TSET 之外, 还有一类重要的能量转移体系, 即通过刚性链连接的 EET 体系, 也称为跨键能量转移(TBET), 如图 1b 所示. TBET 体系中供体和受体均处于同一分子内, 二者之间的空间距离相比 TSET 体系要小,

并且空间取向较为固定,不易发生改变,可以通过电子云的重叠区域实现电子交换,从而使能量由供体转移至受体.由于电子交换的速率相比于偶极耦合更为快速,因此,与 TSET 体系相比, TBET 型能量转移体系表现出较快的能量转移速率,并且在一定的空间距离内, TBET 体系的能量转移效率基本不受空间距离与光谱交盖的影响.

与 TSET 体系的连接方式不同, TBET 体系中供体和受体之间通过刚性的、部分共轭的 π 电子体系进行连接,最为常见的 π 电子体系是苯乙炔、二苯乙炔等结构单元^[23~25]. Topp 和 Burgess 等^[23]设计并合成了 3 个系列的基于苯乙炔、二苯乙炔连接单元的 TBET 体系 I, 如图 2 所示, 由于供受体 S_0 - S_1 能级间跃迁矩的取向不同, 使得三类能量转移体系在能量转移速率上呈现出明显不同. 当供受体间跃迁矩取向处于同一轴线上时, 如 I-1 所示, 能量转移速率最快, 能量转移所用的时间最短 (<0.2 ps), 此时供受体间空间距离的适当增大或减小不会对能量转移速率产生影响; 其次是供受体间跃迁矩取向相互垂直, 如 I-2 所示, 此时能量转移所用的时间处于 ~ 0.4 ps, 而该能量转移过程也不受供受体间光谱交盖程度的影响; 当供受体间跃迁矩取向保持平行时, 如 I-3 所示, 能量转移的速率最慢, 约为 6 ps, 但依然比 TSET 体系要快得多, TSET 体系的能量转移时间一般处于 20~50 ps. TSET 和 TBET 体系的不同点不仅仅在于其连接方式的不同, 更重要是体现在供/受体间的能量转移速率不同, 通常 TBET 体系的能量转移速率比 TSET 体系要高 1~2 个数量级^[21].

1.3 影响 EET 效率的因素

无论是 TSET 还是 TBET 体系, 其能量转移过程都受到多种因素的干扰, 有时可能是多种因素共同作用的结果. EET 体系中供体与受体间的能量转移过程会受到

三方面因素的影响: (1) 供体的发射光谱和受体的吸收光谱存在一定程度的重叠或交盖. 光谱重叠的程度取决于荧光团自身的光谱性质, 改变供受体间的光谱交盖程度, 可以有效调控能量转移效率, 从而使供受体荧光峰呈现双波长比率的变化. 选择合理的供/受体荧光团, 对于成功设计 EET 比率型荧光探针至关重要. (2) 供体和受体之间具有合适的空间距离, 一般介于 1~100 Å. 该空间距离是调控能量转移过程的另一个重要因素. 通过改变供体荧光团与受体荧光团的距离, 可以调控能量转移的效率. 当激发供体时可以观测到供/受体各自荧光强度发生改变, 在荧光光谱上直观表现为波长比率值的变化, 这为设计基于 EET 机理的比率型荧光探针提供了理论依据. 因此, 利用调控供受体的空间距离设计 EET 比率型荧光探针是设计 EET 型荧光探针另一主要方式. (3) 除了上述两个基本条件之外, 供体和受体之间的连接方式也是影响供受体间能否发生能量转移的重要因素. EET 体系中的供受体通常要通过一个非共轭的连接臂相连, 该连接臂可以是柔性的烷烃链, 也可以是刚性的芳环. 无论采用何种连接方式, 在设计 EET 体系时荧光团之间的电子转移不容忽视, 因为分子内的电子转移效率往往比荧光团间的能量转移效率高得多^[26~29].

2 EET 比率型荧光探针的研究进展

2.1 基于丹磺酰胺为供体的 EET 比率型荧光探针

丹磺酰胺的吸收光谱处于 330~400 nm, 荧光发射光谱位于 460~600 nm, 其作为能量转移供体通常要与长发射的荧光团构建 EET 体系, 其中能量受体通常选用罗丹明系列荧光团. 2008 年 Park 和 Kim 等^[30]报道了基于丹磺酰胺为能量供体、罗丹明 B 荧光团作为能量受体, 通过三氨乙基胺柔性链作为连接臂和识别位点, 设

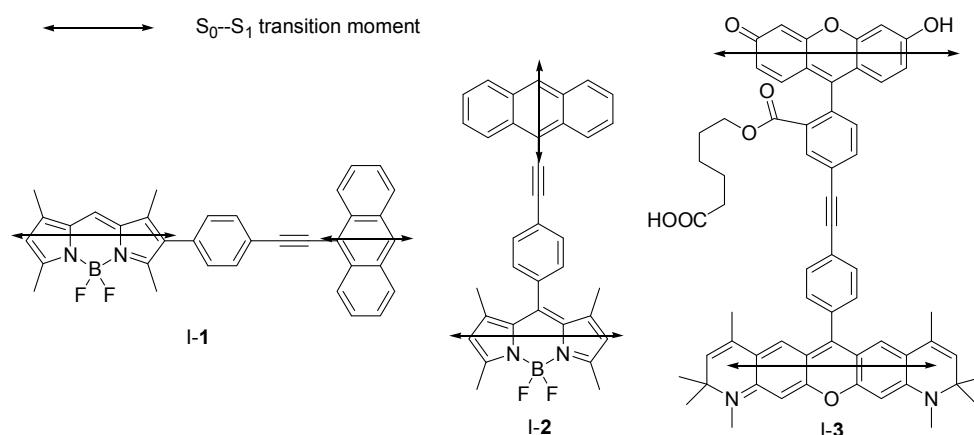


图 2 供受体具有不同空间取向的 TBET 能量转移体系

Figure 2 TBET cassettes with different orientations between donor and acceptor

计 Cu^{2+} 比率型荧光探针 **1** (图3). 该探针能够于水溶液中快速地检测铜离子, 其与 Cu^{2+} 的络合常数为 $7.0 \times 10^3 \text{ mol/L}$. 在没有 Cu^{2+} 存在下, 探针 **1** 由于罗丹明螺内酰胺呈闭环形式, 其吸收峰位于紫外区, 在可见区无吸收、无荧光, 当用 420 nm 的激发光激发丹磺酰胺荧光团时, 由于供受体间光谱无交盖, 能量转移不能发生, 此时只能观测到受体丹磺酰胺在 507 nm 处发射的绿色荧光; 结合 Cu^{2+} 后, 罗丹明螺环被打开, 罗丹明荧光团在可见区的吸收和荧光得以恢复, 当用 420 nm 的激发光激发丹磺酰胺荧光团时, 能量由丹磺酰胺转移至罗丹明荧光团, 能量转移效率达到 93%, 此时可以观测到探针 **1** 在 580 nm 处发射的红色荧光. 随着铜离子的不断加入, 探针 **1** 在 507 和 580 nm 处呈现双波长比率的变化. 探针 **1** 是通过调控供受体间的光谱交盖程度实现对能量转移过程的调控, 最终实现了对溶液中 Cu^{2+} 的比率检测. 然而由于丹磺酰胺荧光团是典型的 ICT 型荧光团, 吸收和荧光光谱谱带较宽, 其与罗丹明的荧光峰存在较大的重叠, 加之丹磺酰胺的激发波长处于紫外区, 最终限制了其用于生物体内 Cu^{2+} 的共聚焦显微成像.

2010 年 Das 等^[31]也报道了基于丹磺酰胺和罗丹明 6G 分别为能量供体和受体的汞离子比率型荧光探针 **2** (图3). 该探针表现出较好的汞离子选择性, 除了铜离子

存在一定的竞争之外, 其他金属离子对其无干扰. 在乙腈与水的混合溶剂中(体积比 1:1), 随着汞离子的加入, 探针 **2** 在 530 nm 处的吸收峰不断增强, 500 nm 处的荧光峰不断减弱, 而 550 nm 处的荧光峰不断增强, 探针与汞离子的络合常数达 $3.9 \times 10^4 \text{ mol/L}$. 探针 **2** 与探针 **1** 识别机理类似, 同样是利用通过调控供受体间的光谱交盖程度实现对能量转移过程的调控. 不同之处在于探针 **2** 中供受体间的连接方式发生了变化, 连接臂与识别位点实现了分离, 这一改变理论上有利于设计多种比率型荧光探针. 然而, 值得注意的是, 在无金属离子存在下, 当激发供体时观测到探针 **2** 在 400~650 nm 的范围内呈现较宽的谱带, 这是由于在溶液中即使无汞离子存在下, 罗丹明螺内酰胺依然存在少量的开环形式, 这表明该连接模式会影响罗丹明螺内酰胺的稳定性^[32].

2.2 基于香豆素为供体的 EET 比率型荧光探针

香豆素及其衍生物是一类重要的香料, 也是重要的荧光染料. 其吸收光谱通常处于 350~450 nm 之间, 荧光光谱处于 400~550 nm. 香豆素也被广泛用作能量供体设计多种 EET 比率型荧光探针, Chang 等^[33]以香豆素为供体, 荧光素为受体设计了比率型过氧化氢探针 **3** (图 4), 供受体间通过稳定构象的环己二胺作为连接臂,

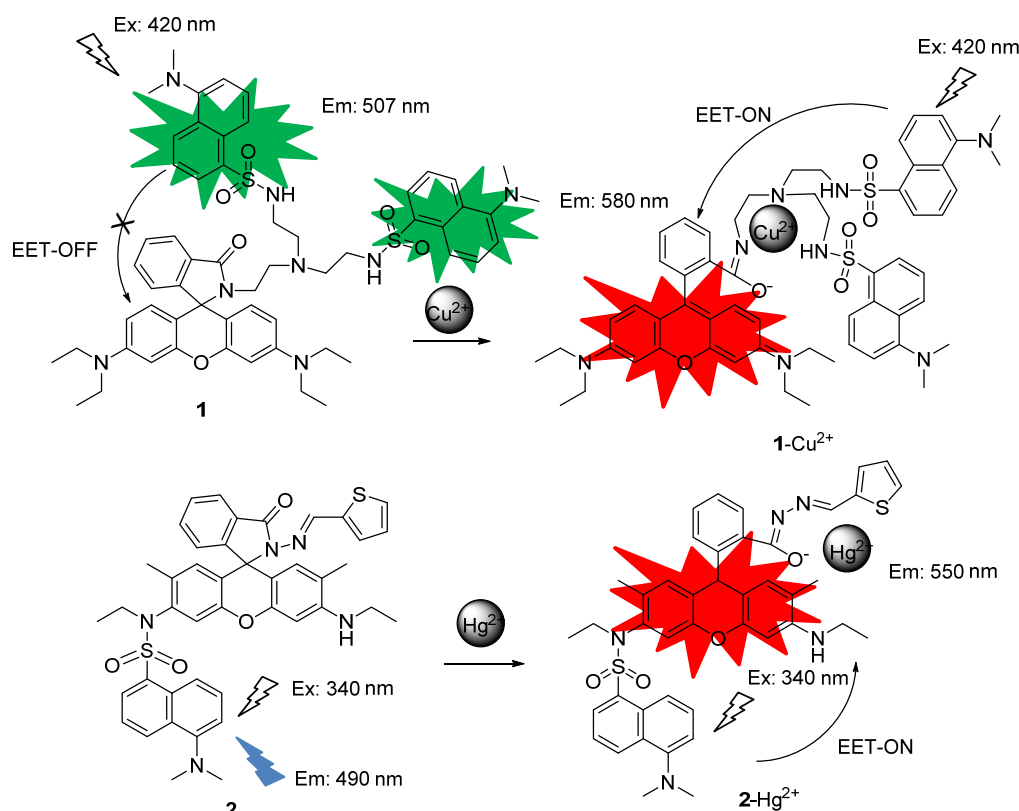


图3 基于丹磺酰胺的 EET 比率型荧光探针

Figure 3 EET ratiometric fluorescent probes with dansylamide fluorophore as energy donor

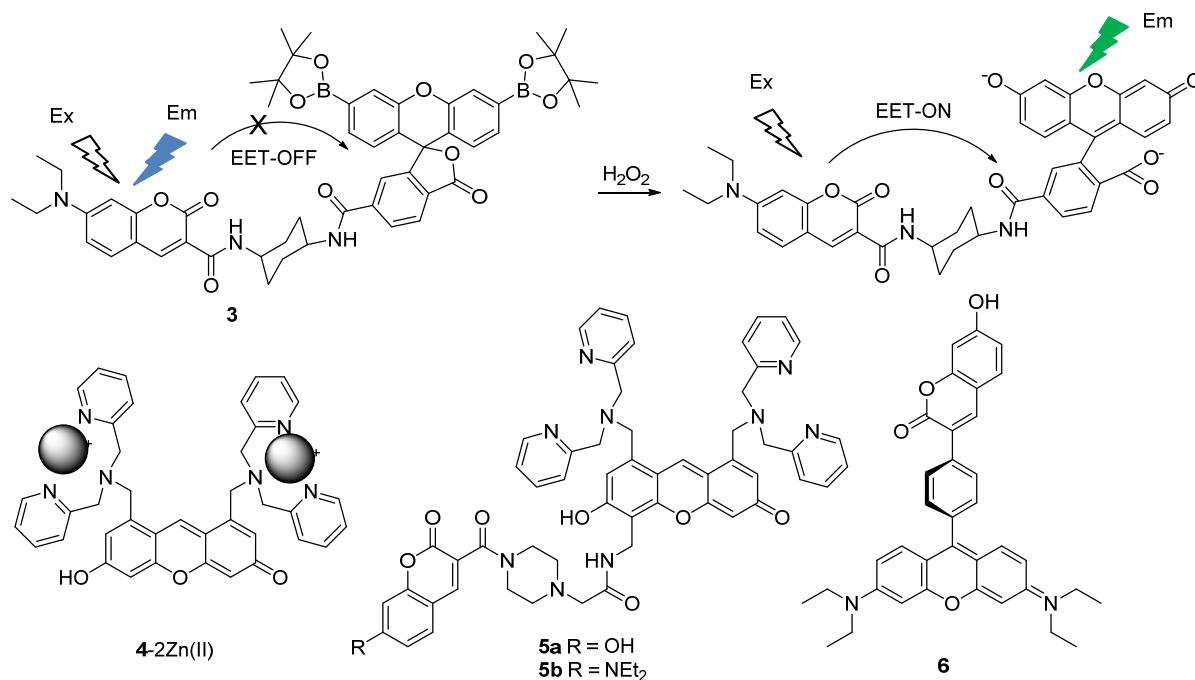


图4 基于香豆素为供体的 EET 比率型荧光探针

Figure 4 EET ratiometric fluorescent probes with coumarin as energy donor

探针分子在未遇到过氧化氢前, 由于荧光素经硼酸酯的“屏蔽(mask)”作用, 其结构为类荧光素螺内酯的环状结构, 其吸收光谱处于紫外区, 与香豆素的发射光谱没有交盖, 所以激发香豆素荧光团时观察不到能量受体的荧光, 只能观测到香豆素的蓝色荧光. 当与过氧化氢作用后, 由于过氧化氢可以解除类荧光素中硼酸酯的“mask”作用, 而使其生成荧光素. 能量受体荧光素的吸收光谱与香豆素的发射光谱存在较大的重叠, 此时能量转移顺利发生. 激发香豆素时可以观察到荧光素的发射光谱, 这一过程实现了 EET 由“关”到“开”的转化, 探针的荧光光谱红移并呈现比率型变化. 该探针被已成功用于细胞内过氧化氢的检测.

Hamachi 等^[34]报道了类荧光素 ATP 荧光探针 **4-2Zn(II)**(图 4), 该探针在与锌离子结合后, 其占吨环能与水分子结合, 生成在可见区无吸收、无荧光的中间体. 当遇到 ATP 后, 失去水分子荧光得以恢复, 与 ATP 作用后荧光明显增强, 增强倍数达到 33 倍. 在水溶液中, **4-2Zn(II)**与 ATP 的结合力较强, 其结合常数达到 1.3×10^6 mol/L. **4-2Zn(II)**的这一性质非常适合设计“开-关”型的 EET 比率型荧光探针. 于是 Hamachi 等以香豆素为能量供体, 以 **4-2Zn(II)**为受体, 通过乙酰基哌嗪作为连接臂, 设计了识别 ATP 的 EET 比率型荧光探针 **5a** 和 **5b**. **5a** 与 **5b** 的区别在于香豆素的结构不同, 其对 ATP 的识别机理与 **4-2Zn(II)**类似, 均是通过与锌离子络合形成 **5a-2Zn(II)**和 **5b-2Zn(II)**, 再与水分子结合形成隐色体,

当与 ATP 作用后, 失去水分子荧光得以恢复. 在这一过程中, 由于香豆素作为能量供体, 用 340 nm 激发光激发香豆素, 由于 **5a-2Zn(II)**的类荧光素荧光团是隐色体, 在可见区无吸收, 能量转移过程处于关闭状态, 只能观测到能量供体香豆素在 454 nm 处的荧光发射; 当遇到 ATP 后, 类荧光素荧光团失去水分子, 其在可见区的吸收恢复, 能量转移过程处于开放状态, 激发供体香豆素可以观测到受体荧光素在 525 nm 处的绿色荧光. 因此识别 ATP 的过程中可以观测到双波长比率的变化, 比率值 R 从 0.14 增加至 1.95, 增幅 ΔR 达 1.81. 该探针已被成功用于细胞内核苷中多磷酸含量的可视化监测, 同时也可以监测 ATP 相关酶的活性.

香豆素作为能量供体, 能量受体可以选用荧光素, 也可以选用罗丹明荧光团. 然而由于香豆素的荧光发射多处于 400~500 nm, 与罗丹明的吸收光谱交盖较少, Lin 等^[35]首次报道了一系列以香豆素为供体, 罗丹明为受体并且具有较大 Stokes 位移的 EET 体系. 其中报道的探针 **6**(图 4)可以作为 EET 比率型 pH 荧光探针, Lin 等借助于 Through-Bond 型能量转移的连接方式, 将光谱交盖较少的香豆素和罗丹明通过刚性的苯环连接在一起, 由于刚性非共轭的连接方式, 使得香豆素至罗丹明的能量转移效率基本不受光谱交盖的影响. 探针 **6**体系中能量由香豆素转移至罗丹明荧光团的效率高达 99%.

2.3 基于萘酰亚胺为供体的 EET 比率型荧光探针

萘酰亚胺荧光染料在荧光探针领域中扮演着重要

的角色, 在阳离子、阴离子及有机小分子的识别上做出了突出的贡献, 而近些年来发现其具有较好的非线性光学特性^[36,37], 使得萘酰亚胺被广泛用于多个领域. 由于萘酰亚胺在 4-位上的衍生方法灵活, 因此其吸收和荧光光谱分布较宽, 吸收光谱通常处于 350~500 nm, 荧光光谱处于 450~550 nm. Ramaiah 等^[38]报道了基于萘酰亚胺和丹磺酰胺的 EET 比率型铜离子荧光探针 **7**(图 5). 萘酰亚胺与丹磺酰胺的吸收光谱极为相近, 在没有铜离子存在下, 激发萘酰亚胺发色团, 由于萘酰亚胺的 4 位没有衍生, 其发射光谱与丹磺酰胺的吸收光谱重叠, 从而发生能量转移, 可以观测到丹磺酰胺在 525 nm 处的荧光发射; 当加入铜离子后, 铜离子与丹磺酰胺结合, 使得丹磺酰胺的吸收光谱出现蓝移, 其与萘酰亚胺的

射光谱重叠较小, 不能发生能量转移, 所以当激发萘酰亚胺时, 只能观测到萘酰亚胺在 375 nm 处的荧光峰, 从而实现了比率识别铜离子. 由于该探针的激发波长为 337 nm, 处于紫外区, 在用于生物样品的检测时, 较短的激发波长会对生物样品造成损伤, 但是该工作具有重要的理论意义, 为设计通过调节光谱移动调控 EET 过程的比率型荧光探针提供了新思路.

Bojinov 等^[39]报道了基于萘酰亚胺为供体、罗丹明 6G 为受体的 EET 比率型 pH 荧光探针 **8**(图 5). 该探针与以往的 EET 比率型荧光探针不同, 在探针 **8** 体系中除位上引入了 *N*-甲基哌嗪, 由于哌嗪结构中的 N 原子能够淬灭萘酰亚胺荧光团. 当溶液的 pH>8.0 时, 受体罗

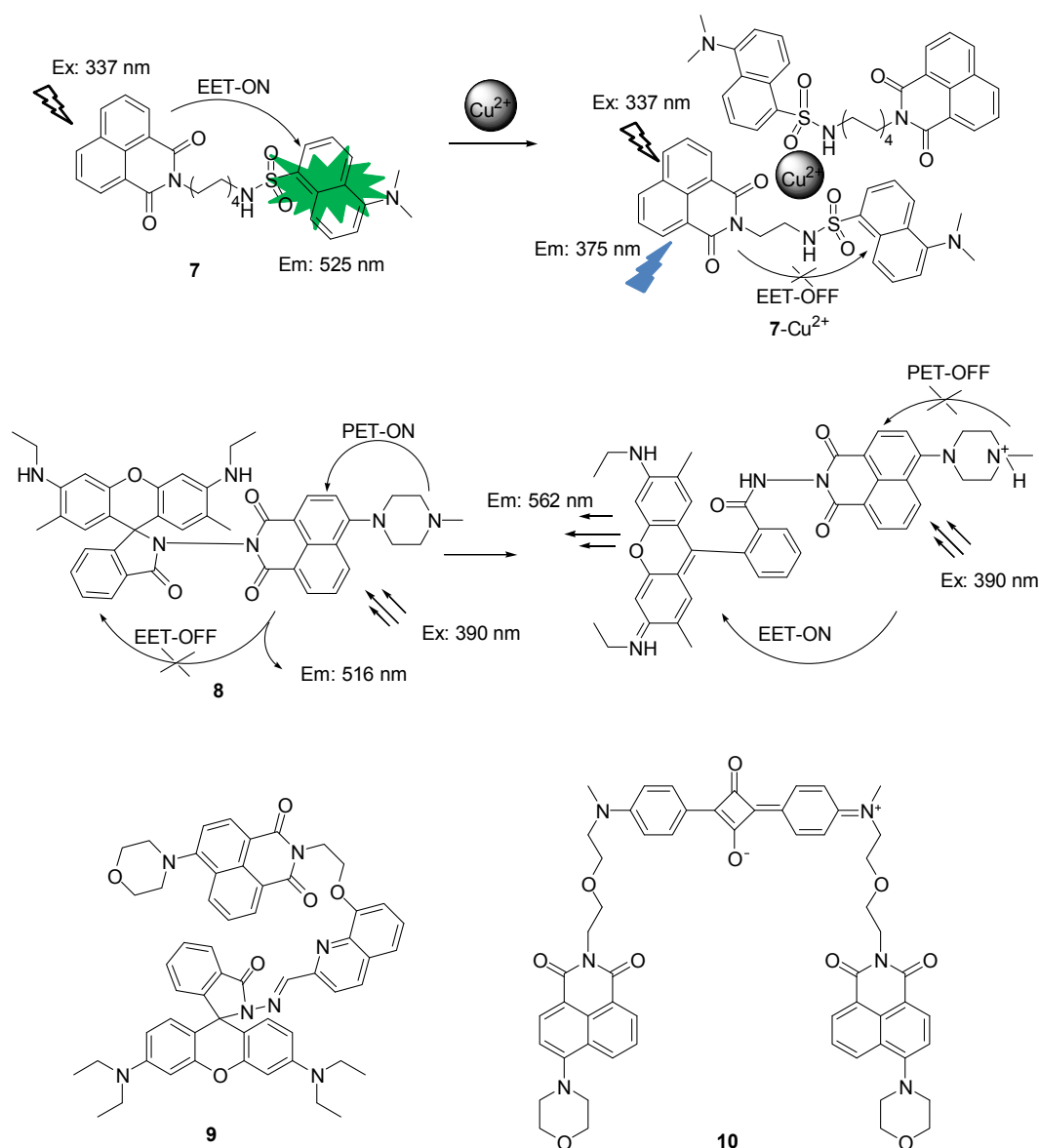


图 5 基于萘酰亚胺为供体的 EET 比率型荧光探针

Figure 5 EET ratiometric fluorescent probes with naphthalimide as energy donor

丹明 6G 处于螺内酰胺结构, 在可见区无吸收无荧光; 此时激发供体萘酰亚胺(Ex: 390 nm), 由于吡啶 N 原子的淬灭作用, 所以只能观测到萘酰亚胺在 514 nm 处微弱的荧光. 随着溶液 pH 的降低, 当溶液的 $7.0 < \text{pH} < 8.0$ 时, 受体罗丹明 6G 荧光团依然处于螺内酰胺结构, 供受体间光谱无交盖, 能量并未发生转移, 而此时吡啶 N 原子的淬灭作用被抑制, 故激发供体可以观测到萘酰亚胺荧光团在 516 nm 处的特征荧光发射. 随着溶液 pH 的进一步降低, 由于罗丹明 6G 的荧光团在此 pH 范围内 ($2.5 < \text{pH} < 7.0$) 会发生质子诱导的螺内酰胺开环反应, 当激发供体时, 由于罗丹明荧光团在可见区有吸收并与供体荧光光谱形成交盖, 能量由萘酰亚胺荧光团转移至罗丹明荧光团, 从而可以明显观测到 516 nm 处的荧光不断减弱, 562 nm 处的荧光不断增强, 呈现双波长比率的变化. 该探针首次将 PET 和 EET 两种机理结合在一起实现对 pH 的检测, 通过荧光峰型以及双波长比率值的变化来估测环境以及生物体内的酸碱度.

Li 等^[40]还报道了基于萘酰亚胺和罗丹明的 EET 比率型铬离子荧光探针 9(图 5), 能量供体和受体之间通过柔性链进行连接. 通过铬离子的络合诱导罗丹明螺内酰胺发生开环反应, 开环后的罗丹明在 568 nm 处有强吸收, 其与萘酰亚胺的荧光光谱交盖增大, 从而实现了能量由萘酰亚胺转移至罗丹明荧光团, 可以观测到 592 nm 处的荧光不断增强, 544 nm 处的荧光不断减弱, 比率值由 0.73 增至 5.63; 探针与铬离子按 1:1 络合, 络合常数为 $9.4 \times 10^3 \text{ mol/L}$. 利用该探针成功实现对细胞内铬离子的比率型荧光成像. 萘酰亚胺除了与罗丹明荧光团搭档之外, 还可以与长波长染料方酸构建 EET 比率型荧光探针. Xiao 课题组^[41]选用长波长、窄峰型的荧光团方酸作为能量受体、萘酰亚胺为能量供体设计了 EET 比率型氰根离子荧光探针 10(图 5). 对于探针 10, 在未加入氰根离子的时候, 激发供体萘酰亚胺, 能量由供体转移至受体方酸, 观测到方酸在 636 nm 处的荧光峰; 当加入氰根离子后, 氰根离子对方酸亲核加成, 改变了方酸的吸收光谱, 使得 EET 不能发生, 最终实现了 EET 由开到关的调控, 并获得荧光的比率变化. 试验中发现, 供体发色团与受体发色团靠得太近会发生明显的电子转移, 通过改变供受体间的空间距离, 可以有效抑制供受体间的电子转移.

2.4 基于荧光素为供体的 EET 比率型荧光探针

荧光素的荧光发射峰处于 500~530 nm, 是常用的供体发色团. 荧光素和罗丹明是最为常见的 EET 能量供体和受体. 荧光素作为能量供体其 5(6)位上的羧基发挥了重要作用. 由于羧基的衍生方式有多种类型, 例如酰胺的方式衍生, Nagano 等^[42]报道一个基于荧光素为

供体, 罗丹明为受体的 EET 比率型羟基自由基荧光探针 11(图 6). 该体系由柔性的过脱氧胸苷二聚体进行连接, 柔性链既是连接臂又是羟基自由基的反应位点, 在没有羟基自由基存在下, 当激发供体 6-FAM (496 nm) 时, 能量转移发生, 观测到受体 5-TAMRA 在 576 nm 处发射荧光. 当遇到羟基自由基后, 羟基自由基会使两个荧光团的连接键断裂, 供体与受体间的空间距离增大. 此时激发供体 6-FAM, 由于荧光素与四甲基罗丹明发色团断开了连接, 空间距离增大不能满足能量转移的必要条件, 因此只能观测到荧光素自身在 518 nm 处的荧光发射. 该探针表现出了较好的选择性和抗干扰性, 其他活性氧与活性氮对其无干扰.

供体荧光素除了借助于羧基通过酰胺键连接受体, 还可以借助于荧光素醛与受体进行连接, 构建 EET 比率型荧光探针. Rusin^[43]和 Lippard 等^[44]报道在 50% NaOH 的溶液中荧光素与氯仿发生 Reimer-Tiemann 反应生成荧光素醛, 荧光素醛被广泛用来设计 PET 型荧光探针. 2010 年 Zhang 等^[45]利用荧光素醛与罗丹明 B 螺内酰胺反应, 通过 Schiff 碱将荧光素和罗丹明荧光团构建在同一 EET 体系中, 设计了 EET 比率型锌离子荧光探针 12(图 6). 当锌离子与探针 12 结合后, 由于锌离子的络合会诱导罗丹明螺内酰胺发生开环反应, 当激发供体荧光素荧光团时能量转移得以发生, 从而观测到双波长比率的变化. 该探针表现出较好的选择性和灵敏度, 其对锌离子的检测极限达到 40 nmol/L. 这要归功于供受体的选择以及供受体间的连接方式. 由于荧光素和罗丹明的发射峰型窄、荧光峰重叠少(半峰宽只有 20~40 nm), 所以双波长比率值的变化较为明显. 细胞成像实验表明探针 12 能够定量检测细胞内的锌离子, 是有潜在应用前景的比率型锌离子荧光探针.

荧光素作为能量供体, 其与能量受体的连接方式还可以采用非共轭的刚性连接模式, 其中最具代表的是 Burgess 研究组^[46-48]在 TBET 体系方面的研究工作. 他们利用荧光素为能量供体, 类罗丹明作为能量受体, 通过非共轭的、刚性的二苯乙炔基将荧光素与罗丹明连接在一起, 设计合成了 TB 型的能量转移体系 13^[46](图 7). 在 pH 8.0 的磷酸盐缓冲溶液中, 化合物 13 只在 556 nm 处呈现出一个强吸收峰; 当用 556 nm 激发化合物 13 时, 观测到受体罗丹明在 579 nm 处发射的强荧光, 同时供体荧光素在 560 nm 处的荧光峰并未完全消失, 这意味着化合物 13 在该条件下能量并未由供体荧光素完全转移至受体罗丹明荧光团, 能量转移效率仅仅为 80%, 然而这并不影响化合物 13 用于对小鼠酰基辅酶 A 蛋白 (ACBP) 的标记以及示踪成像. 值得注意的是, 化合物 13 体系中由于供受体的吸收和发射光谱交盖过大, 化

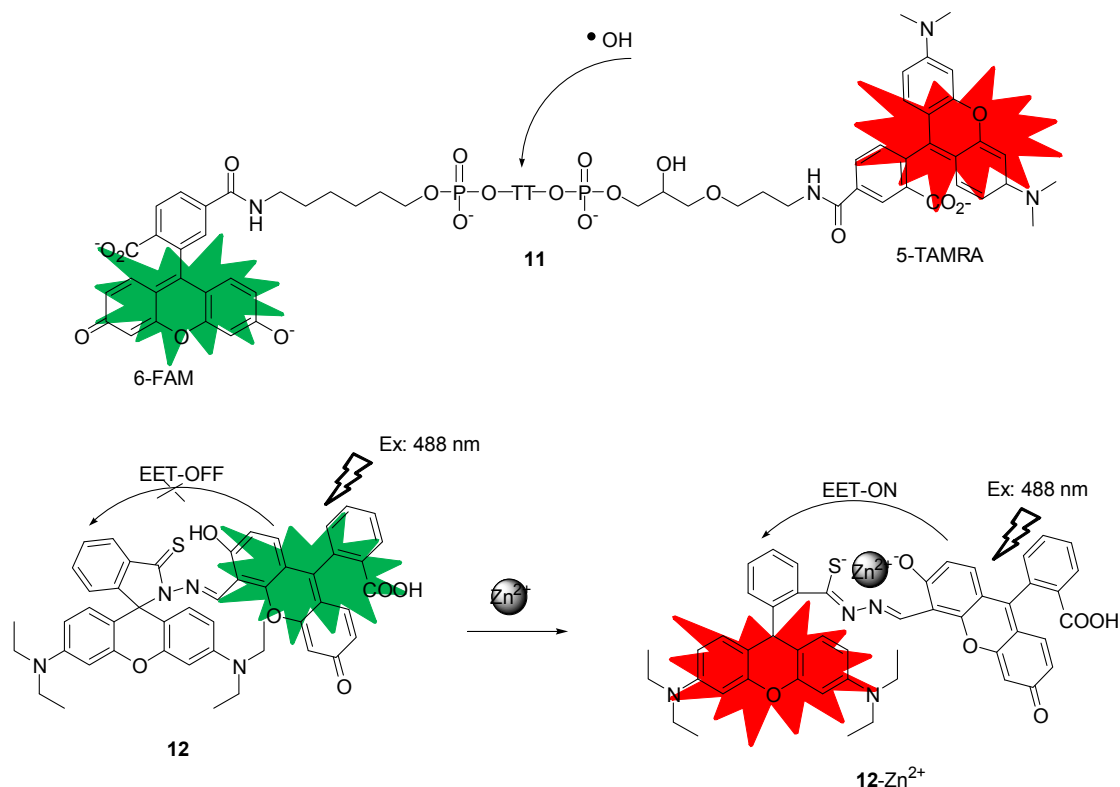


图6 基于荧光素为供体的 EET 比率型荧光探针

Figure 6 EET ratiometric fluorescent probes with fluorescein as energy donor

合物 **13** 在 556 nm 处的吸收峰是由供受体荧光团各自吸收峰叠加而成。随后 Burgess 研究组^[47]采用长波长的罗丹明为受体设计合成了能量转移体系 **14** (图 7)。化合物 **14** 与化合物 **13** 相比, 不同点在于化合物 **14** 将标记位点设计在荧光素 2 羧基上, 使该荧光素与罗丹明的体系设计成具有通用性的 EET 标记试剂, 这为设计其他新型的 EET 标记试剂具有重要的启示意义。在使用化合物 **14** 对 ACBP 标记示踪成像中, 发现化合物 **14** 在细胞中的光谱性质与其在体外磷酸盐缓冲溶液中(pH 8.0)不同, 其原因可能是受到细胞微环境的干扰, 这种干扰主要来自于细胞内酸碱性的不均一以及供体荧光素的 pH 敏感性。于是 Burgess 等^[48]设计了以荧光素为能量供体、氟硼吡咯为能量受体的 EET 体系 **15** (FB)(图 7), 该体系中能量供体和能量受体依然通过苯乙炔基进行连接, 并将 FB 体系成功应用于细胞内 pH 的比率监测。荧光素对中性 pH 较为敏感, 其荧光在 pH 6.5~7.0 范围内变化明显, 因此 FB 体系中的供体荧光素也具有 pH 敏感性。当溶液的 pH < 6.0 时, 荧光素在溶液中以未解离的酚羟基 (FB-phenolic form) 的形式存在, 488 nm 激发供体荧光素发色团后, 能量由荧光素转移至氟硼吡咯荧光团, 故可以观测到受体氟硼吡咯在 600 nm 处的荧光峰; 当溶液的 pH > 6.5 时, 荧光素在溶液中的主要存在形式是解离的酚羟基 (FB-phenolatic form) 形式, 激发供体荧光素发

色团, 此时仅有少量能量由供体转移至受体, 故可以观测到能量供体荧光素在 525 nm 处的荧光峰。该探针在 pH 5.0~8.0 的溶液中能够比率的监测 pH 的变化。经过体外的校正试验后, 探针 FB 已被成功用于细胞内 pH 的比率成像, 并且可以定量的检测和监测细胞内 pH 的变化。

2.5 基于氟硼吡咯(BODIPY)为供体的 EET 比率型荧光探针

氟硼吡咯即氟化硼络合二吡咯甲川(Boron Dipyrromethene, BODIPY)是一类重要的荧光发色团, 其于 1968 年被首次报道后, 直到最近一二十年才被人们广泛关注和利用。氟硼吡咯荧光染料具有非常优异的光化学物理性能, 例如: (1)其摩尔消光系数高, 在可见区 400~520 nm 范围内摩尔消光系数高达 $\approx (5\sim7)\times 10^4$ L/mol·cm; (2)其荧光量子产率高, 荧光量子产率高达 0.8~1, 即使在水溶液中也具有较高的荧光量子产率; (3)其光谱性质非常稳定, 不易受到溶剂极性和 pH 值的影响。与 ICT 型荧光染料相比不存在“溶剂化效应”。(4)其荧光光谱峰宽较窄, 半峰宽通常不超过 50 nm, 与同为绿光区的荧光素相比具有更加稳定的 pH 不敏感性; (5)光稳定性高, 其光稳定性要明显优于同波段的荧光素和罗丹明 110。因此, 氟硼吡咯优异的性能使其被广泛用于有机功能材料和生物荧光检测等领域。

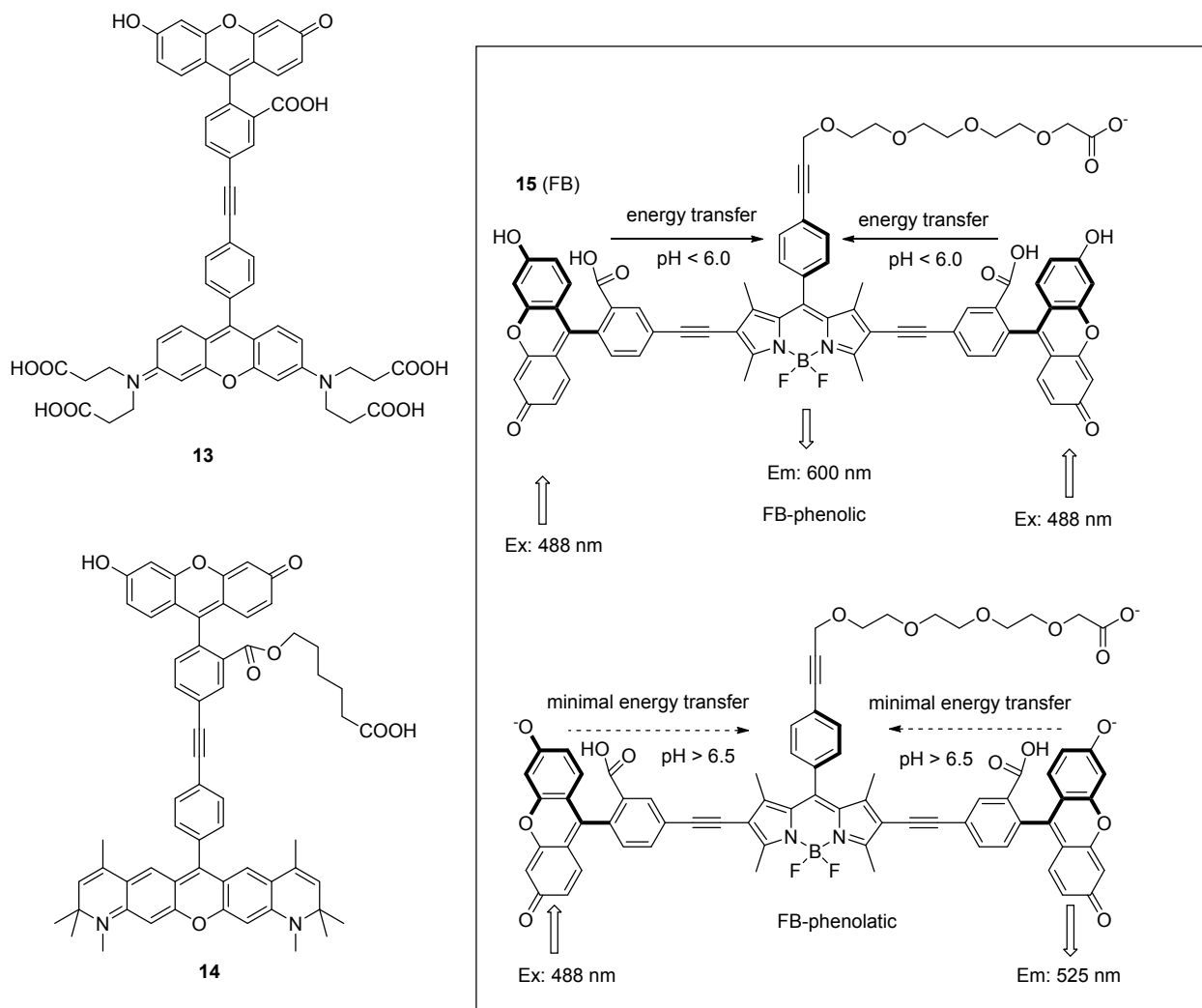


图7 基于荧光素为供体的TBET比率型荧光探针

Figure 7 TBET ratiometric fluorescent probes with fluorescein as energy donor

BODIPY 的结构修饰有多种方式^[49~52], 通过修饰人们可以获得不同发射波长的 BODIPY 荧光染料, 因此基于 BODIPY 的 EET 荧光探针也是较为常见. Akkaya 研究组^[53,54]设计了以短波长的 BODIPY 为供体、长波长的 BODIPY 为受体的银离子和汞离子荧光探针 **16** 和 **17**(图8). 在与银离子或汞离子结合前后, 能量转移过程一直保持着“开”的状态. 在未结合目标客体时, 当激发供体, 能量转移至长波长 BODIPY. 由于受体的荧光较弱, 故只能观测到微弱的受体荧光. 当探针与目标客体结合后, 由于能量转移过程并未发生改变, 故激发供体能够观测到受体的荧光增强. 尽管受体部分在识别银离子时有波长的蓝移, 但由于识别前荧光很弱, 所以识别后可以看作荧光增强型识别, 而观测不到双波长比率的变化. 通过氟硼吡咯自身构建比率型荧光探针的目的并未实现, 除此之外该体系还存在的不足之处在于, BODIPY 染料具有很强的疏水性, 这些探针在使用过程

中必须加入大量的有机溶剂, 因此限制了此类探针的应用. 然而, 该探针的优势在于短波长氟硼吡咯的引入, 使得探针分子的斯托克位移可增加至 100 nm 以上; 同时该体系中 BODIPY 采用刚性非共轭的连接方式, 使得能量转移效率高达 99%, 这些均为设计大斯托克位移、高能量转移效率的荧光探针提供了新的设计思路.

近年来, 罗丹明隐色体的开关环反应被广泛用于设计增强型荧光探针. 众所周知, 罗丹明的 2-羧基与伯胺反应后由于氨基的亲核性, 会最终形成闭环并且结构稳定的罗丹明螺内酰胺结构, 该结构在可见区无荧光无吸收, 但在目标客体的诱导下又会发生开环反应, 生成强荧光的罗丹明衍生物, 在 550~650 nm 呈现出强荧光、在 540~600 nm 范围内呈现强吸收^[55]. 罗丹明的长波长发射以及螺内酰胺开关环特征反应, 使其非常适合作为能量转移的受体来设计 EET 比率型荧光探针, 这一点已被丹磺酰胺供体的 EET 比率型荧光探针所验证^[30,31].

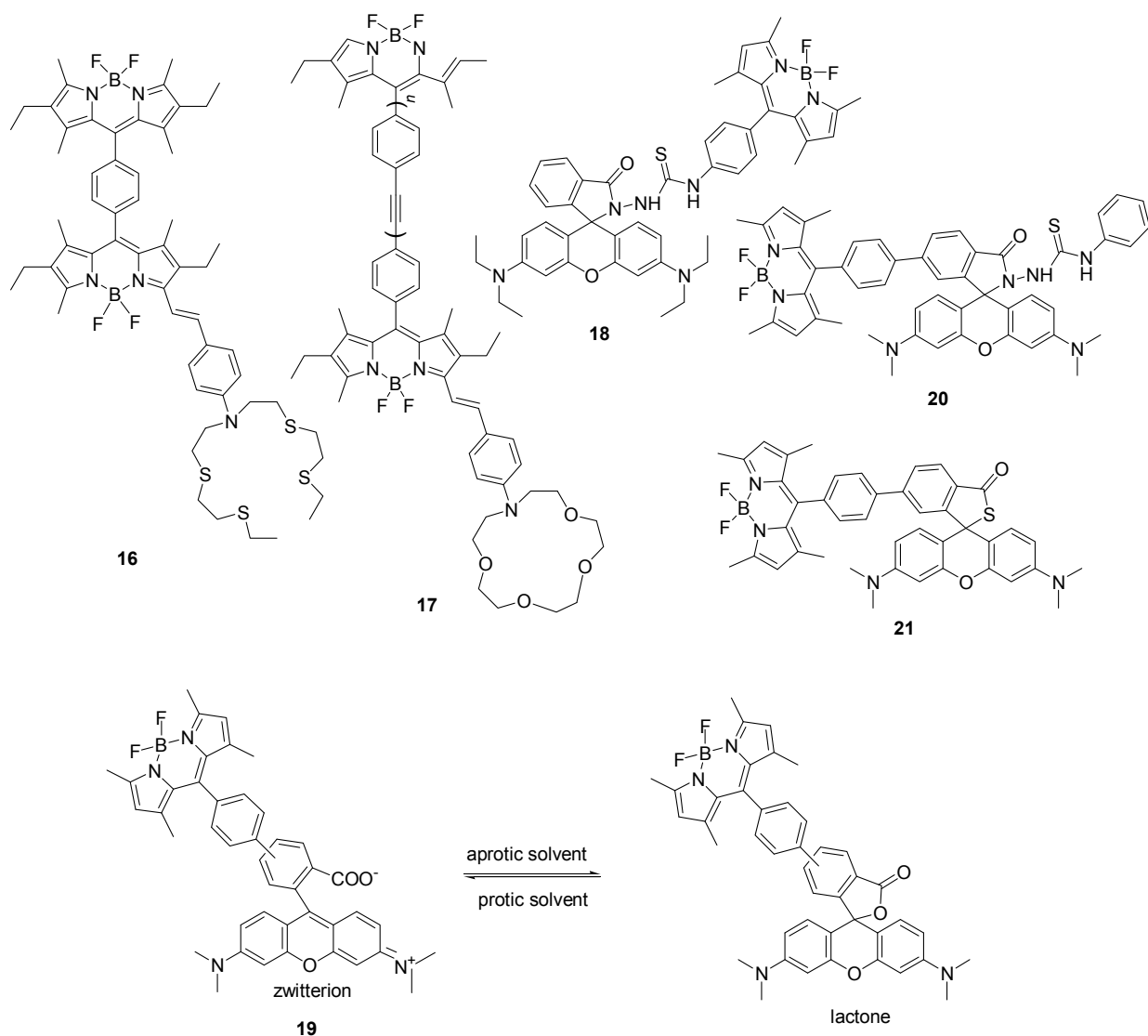


图 8 基于氟硼吡咯为供体的 EET 比率型荧光探针

Figure 8 EET ratiometric fluorescent probes with BODIPY as energy donor

BODIPY 优异的光谱特性使其成为罗丹明 EET 比率型荧光探针设计中能量供体的首选发色团。2008 年 Xiao 课题组^[56]利用罗丹明螺内酰胺的开关环反应, 首次以 BODIPY 为能量供体、罗丹明螺内酰胺为受体设计了 EET 比率型汞离子荧光探针 **18**(图 8), 该探针实现了对汞离子的高灵敏、高选择性的定量检测。随着汞离子的不断加入, 探针在 560 nm 处的吸收峰不断增强, 这是由于汞离子的诱导脱硫使得罗丹明的螺内酰胺开环并生成稳定的噻唑结构, 开环后的罗丹明衍生物的最大吸收峰处于 560 nm 处; 随着汞离子的不断加入, 探针的荧光光谱在 514 nm 处的发射峰逐渐减弱, 589 nm 处的发射峰逐渐增强, 荧光光谱最大发射波长红移可达 75 nm, 呈现出明显的双波长比率变化, 比率值介于 0~5.5 之间。细胞比率成像实验表明, 探针 **18** 能够借助于比率值

的大小对细胞内的汞离子进行定量检测。该结果进一步证明氟硼吡咯和罗丹明的组合在设计高灵敏的 EET 比率型荧光探针方面具有明显优势。

探针 **18** 与探针 **1**、探针 **9** 以及探针 **12** 等 EET 比率型荧光探针相比具有一个共同的特点: 能量供体发色团与罗丹明单元的链接位点处于螺内酰胺一侧, 并且与探针的识别位点融合在一起。这一共性使得在利用 EET 机理设计比率型荧光探针的时候缺乏通用性, 尤其是在设计探针时需要充分考虑识别位点与能量供体之间的合理连接方式。与众多的增强型罗丹明荧光探针相比, 这些探针的设计模式不具有通用性。为了构建比率型荧光探针的通用型能量转移平台, Xiao 课题组^[57]首次报道了基于 BODIPY 为能量供体、罗丹明为能量受体的平台分子 **19** (BRP)(图 8)。为了实现平台的通用性, Xiao 等^[58]

将罗丹明的 2 位羧基予以保留外, 同时为了获得带有其他的活性基团的罗丹明, 该课题组首次成功合成分离得到单一取代的 5/6 溴代四甲基罗丹明(TMR), 通过高效的 Pd 催化偶联反应将 BODIPY 与 TMR 荧光团构建 EET 平台分子 BRP, BRP 分子在质子和非质子型溶剂中分别呈现出橙色和绿色荧光. 为了进一步验证平台具有设计 EET 比率型荧光探针的通用性, 该课题组^[57]还报道了两个基于 BRP 的汞离子比率型荧光探针 **20** 和 **21** (图 8). 随着汞离子浓度的增加(0~0.35 $\mu\text{mol/L}$), 探针 **20** 在 562 nm 处出现新的吸收峰, 随着汞离子的不断加入, 该吸收峰不断增强, 同时 BODIPY 发色团的吸收峰(λ_{abs} 500 nm)也有所增强; 荧光光谱呈现双波长比率变化, 510 nm 处荧光峰不断降低, 584 nm 处的荧光峰不断增强, 如图 9 所示. 当汞离子浓度处于 0.03~0.3 $\mu\text{mol/L}$ 范围内, I_{584}/I_{510} 比率值与汞离子的浓度成非线性关系, 其数值介于 0~7 之间, 荧光比率变化范围较宽并且变化明显, 探针 **20** 具有较高的灵敏度. 与探针 **20** 相似, 探针 **21** 在遇到汞离子后也呈现出双波长比率的变化; 不同之处在于, 当汞离子的浓度处于 6.5~62.5 $\mu\text{mol/L}$ 范围内, I_{585}/I_{510} 比率值与汞离子的浓度成良好的线性关系, 如图 9 所示; 共聚焦成像表明 BRP 平台具有普遍适用性, 并且基于 BRP 能量转移体系的平台, 可以成功地设计多种比率型荧光探针, 这必将为设计针对不同客体的比率型荧光探针提供更多可视化的工具.

3 展望

随着对荧光染料性能和能量转移机理研究的不断深入, 人们对能量转移的过程以及能量转移过程的调控

越来越熟悉, 设计的能量转移体系多种多样、纷繁复杂. 在 EET 体系的设计中, 较为常见的荧光团有香豆素、荧光素、罗丹明、氟硼吡咯 BODIPY、萘酰亚胺等, 通过选用不同的荧光团分别作为能量供体或受体, 可以构建多种 EET 体系; 加之近年来, 许多新型的荧光团被不断地设计合成出来^[59~61], 这为构建多功能化的 EET 体系提供了更多的选择.

随着新兴的荧光显微技术的出现与技术革新, 基于 EET 的比率型荧光探针目前面临着极佳的发展机遇, 但同样也面临着挑战. 首先 EET 机理与其他机理相比, 尽管在一定程度上能够克服溶剂化效应、具有比率值变化更为明显等优势, 但是在设计合成上 EET 体系合成困难, 体系较为复杂, 并且不具备设计不同客体的通用性. 因此, EET 比率型荧光探针在设计上急需构建更多的平台分子, 以便简化 EET 比率型荧光探针的合成; 其次, 香豆素、萘酰亚胺、丹磺酰胺等分子内电荷转移(ICT)型荧光团在极性溶剂中存在明显的溶剂化效应, 目前 EET 比率型荧光探针中多选用这些荧光团作为供体, 导致 EET 比率型荧光探针的光谱和比率值会受到溶剂极性的干扰. 而且这些荧光团的激发波长通常处于紫外区, 激发光会对生物样品产生极大的损伤, 限制了其在生物成像领域的应用. 可供选择的供体荧光团相对较少, 因此急需研发不受溶剂极性、pH 影响以及光稳定性和溶解性均较好的荧光团. 此外, 目前在 EET 比率型荧光探针的设计中绝大多数采用光谱交盖原理的设计模式, 而利用调控空间距离的方式来设计比率型荧光探针还具有极大的发展空间.

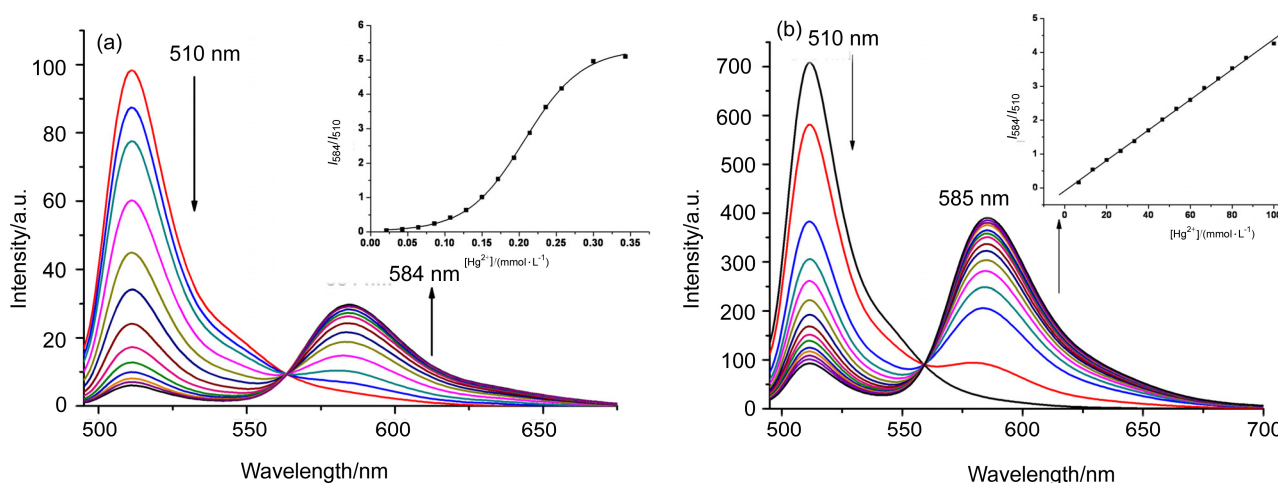


图 9 随着汞离子的加入探针 **20** (a) 和 **21** (b) 在乙腈的水溶液($\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$, $V:V=80:20$, pH 7.2 HEPES)中的荧光光谱变化
Figure 9 Changes in the emission spectra of **20** (a) and **21** (b) in $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ ($V:V=80:20$) at pH 7.2 (0.01 mol/L HEPES) upon the gradual addition of Hg^{2+}

Inset: the ratio intensity at two emission wavelengths upon the gradual addition of Hg^{2+}

有机荧光团中可作为 EET 供体和受体还远不止上述这些, 其它如菁染料也是应用较广泛的一类. 基于 EET 机理的比率型荧光探针, 以其激发波长单一、双发射峰重叠少、比率值变化灵敏且不易受到干扰等优势, 必将成为比率型荧光探针的设计主流.

References

- [1] (a) Wang, F.; Wang, L.; Chen, X.; Yoon, J. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, 43, 4312.
(b) Ding, Y.; Li, X.; Li, T.; Zhu, W.; Xie, Y. *J. Org. Chem.* **2013**, 78, 5328.
(c) Huang, Y.; Wang, M.; She, M.; Yang, Z.; Liu, P.; Li, J.; Shi, Z. *Chin. J. Org. Chem.* **2014**, 34, 1 (in Chinese).
(黄阳阳, 王梦嘉, 庠梦尧, 杨征, 刘萍, 李剑利, 史真, 有机化学, **2014**, 34, 1.)
(d) Chu, N.; Feng, C.; Ji, M.; *Acta Chim. Sinica* **2013**, 71, 1459 (in Chinese).
(楚宁宁, 冯成亮, 吉民, 化学学报, **2013**, 71, 1459.)
- [2] (a) Zhou, J.; Yang, M.; Meng, W.; Cheng, Z.; Yang, B. *Chin. J. Org. Chem.* **2014**, 34 1646 (in Chinese).
(周佳, 杨美盼, 孟文斐, 成昭, 杨秉勤, 有机化学, **2014**, 43, 1646.)
(b) Zhang, Y.; Li, W.; Wang, Q.; Zhang, R.; Xiong, Q.; Shen, X.; Guo, J.; Chen, X. *Acta Chim. Sinica* **2013**, 71, 1496 (in Chinese).
(张勇, 李伟, 王强, 张若璇, 熊启杰, 沈祥, 郭靖, 陈雪梅, 化学学报, **2013**, 71, 1496.)
(c) Xiang, C.; Liu, H.; Meng, Q.; Lan, M.; Wei, G. *Acta Chim. Sinica* **2013**, 71, 1435 (in Chinese).
(向德成, 刘恒, 孟庆华, 蓝闽波, 卫钢, 化学学报, **2013**, 71, 1435.)
- [3] Grabowski, Z. R.; Rotkiewicz, K.; Rettig, W. *Chem. Rev.* **2003**, 103, 3899.
- [4] Komatsu, T.; Urano, Y.; Fujikawa, Y.; Kobayashi, T.; Kojima, H.; Terai, T.; Hanaoka, K.; Nagano, T. *Chem. Commun.* **2009**, 45, 7015.
- [5] de Silva, A. P.; Gunaratne, H. Q.; Gunnlaugsson, T.; Huxley, A. J.; McCoy, C. P.; Rademacher, J. T.; Rice, T. E. *Chem. Rev.* **1997**, 97, 1515.
- [6] Lim, C. S.; Masanta, G.; Kim, H. J.; Han, J. H.; Kim, H. M.; Cho, B. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 11132.
- [7] Zhang, J. F.; Lim, C. S.; Bhuniya, S.; Cho, B. R.; Kim, J. S. *Org. Lett.* **2011**, 13, 1190.
- [8] Grynkiewicz, G.; Poenie, M.; Tsien, R. Y. *J. Biol. Chem.* **1985**, 25, 3440.
- [9] Tsien, R. Y.; Rink, T. J.; Poenie, M. *Cell Calcium* **1985**, 6, 145.
- [10] (a) Peng, X.; Du, J.; Fan, J.; Wang, J.; Wu, Y.; Zhao, J.; Sun, S.; Xu, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 1500.
(b) Lu, C. L.; Xu, Z. C.; Cui, J. N.; Zhang, R.; Qian, X. H. *J. Org. Chem.* **2007**, 72, 3554.
(c) Zhu, B.; Zhang, X.; Li, Y.; Wang, P.; Zhang, H.; Zhuang, X. *Chem. Commun.* **2010**, 46, 5710.
(d) Cui, L.; Zhong, Y.; Zhu, W.; Xu, Y.; Du, Q.; Wang, X.; Qian, X.; Xiao, Y. *Org. Lett.* **2011**, 13, 928.
(e) Cao, X.; Lin, W.; Yu, Q.; Wang, J. *Org. Lett.* **2011**, 13, 6098.
(f) Wan, Q.; Song, Y.; Li, Z.; Gao, X.; Ma, H. *Chem. Commun.* **2013**, 49, 502.
- [11] (a) Li, C. Y.; Zhang, X. B.; Qiao, L.; Zhao, Y.; He, C. M.; Huan, S. Y.; Lu, L. M.; Jian, L. X.; Shen, G. L.; Yu, R. Q. *Anal. Chem.* **2009**, 81, 9993.
(b) Ueyama, H.; Takagi, M.; Takenaka, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 14286.
(c) Lee, L. G.; Spurgeon, S. L.; Heiner, C. R.; Benson, S. C.; Rosenblum, B. B.; Menchen, S. M.; Graham, R. J.; Constantinescu, A.; Upadhyay, K. G.; Cassel, J. M. *Nucleic Acids Res.* **1997**, 25, 2816.
- [12] Yu, H.; Jin, L.; Dai, Y.; Li, H.; Xiao, Y. *New J. Chem.* **2013**, 37, 1688.
- [13] Othman, A. B.; Lee, J. W.; Wu, J. S.; Kim, J. S.; Abidi, R.; Thuery, P.; Strub, J. M.; Dorsselaer, A. V.; Vicens, J. *J. Org. Chem.* **2007**, 72, 7634.
- [14] (a) Liu, J. Y.; Yeung, H. S.; Xu, W.; Li, X.; Ng, D. K. *Org. Lett.* **2008**, 10, 5421.
(b) Kumar, M.; Kumar, N.; Bhalla, V.; Singh, H.; Sharma, P. R.; Kaur, T. *Org. Lett.* **2011**, 13, 1422.
- [15] Speiser, S. *Chem. Rev.* **1996**, 96, 1953.
- [16] Fan, J.; Hu, M.; Zhan, P.; Peng, X. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42, 29.
- [17] Diring, S.; Puntoriero, F.; Nastasi, F.; Campagna, S.; Ziessel, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 6108.
- [18] Zhang, X.; Xiao, Y.; Qian, X. *Org. Lett.* **2008**, 10, 29.
- [19] Wu S.-K. *Supramolecular Photochemistry Introduction: Fundamentals and Applications*, Science Press, Beijing, **2005** (in Chinese).
(吴世康, 超分子光化学导论: 基础与应用, 科学出版社, 北京, **2005**.)
- [20] Kautsky, H. *Trans. Faraday Soc.* **1939**, 35, 216.
- [21] Knibbe, H.; Rehm, D.; Weller, A. *Ber. Bunsen-Ges. Phys. Chem.* **1968**, 72, 257.
- [22] Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed., Springer, New York, **2006**, pp. 443~449.
- [23] Kim, T. G.; Castro, J. C.; Loudet, A.; Jiao, J. G.; Hochstrasser, R. M.; Burgess, K.; Topp, M. R. *J. Phys. Chem. A* **2006**, 110, 20.
- [24] Ueno, Y.; Jose, J.; Loudet, A.; Perez-Bolivar, C.; Anzenbacher, P., Jr.; Burgess, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 51.
- [25] Ziessel, R.; Goze, C.; Ulrich, G.; Cesario, M.; Retaillieu, P.; Harri-man, A.; Rostron, J. P. *Chem. Eur. J.* **2005**, 11, 7366.
- [26] Sapsford, K. E.; Berti, L.; Medintz, I. L. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **2006**, 45, 4562.
- [27] Kasha, M. *J. Chem. Phys.* **1952**, 20, 71.
- [28] Wahlroos, R.; Toivonen, J.; Tirri, M.; Hanninen, P. *J. Fluoresc.* **2006**, 16, 379.
- [29] Liu, J. Y.; Ermilov, E. A.; Roder, B.; Ng, D. K. *Chem. Commun.* **2009**, 1517.
- [30] Lee, M. H.; Kim, H. J.; Yoon, S.; Park, N.; Kim, J. S. *Org. Lett.* **2008**, 10, 213.
- [31] Suresh, M.; Mishra, S.; Mishra, S. K.; Suresh, E.; Mandal, A. K.; Shrivastav, A.; Das, A. *Org. Lett.* **2009**, 11, 2740.
- [32] Li, J.; Petrassi, H. M.; Tumanut, C.; Masick, B. T.; Trussell, C.; Harris, J. L. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, 17, 1064.
- [33] Albers, A. E.; Okreglak, V. S.; Chang, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 9640.
- [34] Kurishita, Y.; Kohira, T.; Ojida, A.; Hamachi, I. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 13290.
- [35] Lin, W.; Yuan, L.; Cao, Z.; Feng, Y.; Song, J. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **2010**, 49, 375.
- [36] Ye, G. J.; Zhao, T. T.; Jin, Z. N.; Cu, P. Y.; Mao, J. Y.; Xu, Q. H.; Xu, Q. F.; Lu, J. M.; Li, N. J.; Song, Y. L. *Dyes Pigm.* **2012**, 94, 271.
- [37] Zhang, J. F.; Lim, C. S.; Bhuniya, S.; Cho, B. R.; Kim, J. S. *Org. Lett.* **2011**, 13, 1190.
- [38] Jisha, V. S.; Thomas, A. J.; Ramaiah, D. *J. Org. Chem.* **2009**, 74, 6667.
- [39] Bojinov, V. B.; Venkova, A. I.; Georgiev, N. I. *Sensors Actuators, B* **2009**, 143, 42.

- [40] Zhou, Z.; Yu, M.; Yang, H.; Huang, K.; Li, F.; Yi, T.; Huang, C. *Chem. Commun.* **2008**, 29, 3387.
- [41] Yu, H.; Fu, M.; Xiao, Y. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, 12, 7386.
- [42] Takakusa, H.; Kikuchi, K.; Urano, Y.; Higuchi, T.; Nagano, T. *Anal. Chem.* **2001**, 73, 939.
- [43] Wang, W.; Rusin, O.; Xu, X.; Kim, K. K.; Escobedo, J. O.; Fakayode, S. O.; Fletcher, K. A.; Lowry, M.; Schowalter, C. M.; Lawrence, C. M.; Fronczek, F. R.; Warner, I. M.; Strongin, R. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 15949.
- [44] Burdette, S. C.; Walkup, G. K.; Spingler, B.; Tsien, R. Y.; Lippard, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 7831.
- [45] Han, Z. X.; Zhang, X. B.; Li, Z.; Gong, Y. J.; Wu, X. Y.; Jin, Z.; He, C. M.; Jian, L. X.; Zhang, J.; Shen, G. L.; Yu, R. Q. *Anal. Chem.* **2010**, 82, 3108.
- [46] Jiao, G. S.; Thoresen, L. H.; Burgess, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 14668.
- [47] Bandichhor, R.; Petrescu, A. D.; Vespa, A.; Kier, A. B.; Schroeder, F.; Burgess, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 10688.
- [48] Han, J.; Loudet, A.; Barhoumi, R.; Burghardt, R. C.; Burgess, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 1642.
- [49] Rurack, K.; Kollmannsberger, M.; Daub, J. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **2001**, 40, 385.
- [50] Umezawa, K.; Matsui, A.; Nakamura, Y.; Citterio, D.; Suzuki, K. *Chem. Eur. J.* **2009**, 15, 1096.
- [51] Zhang, X.; Yu, H.; Xiao, Y. *J. Org. Chem.* **2012**, 77, 669.
- [52] Zhou, Y.; Xiao, Y.; Chi, S.; Qian, X. *Org. Lett.* **2008**, 10, 633.
- [53] Coskun, A.; Akkaya, E. U. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 10464.
- [54] Coskun, A.; Akkaya, E. U. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 14474.
- [55] Yu, H. *Ph.D. Dissertation*, Dalian University of Technology, Dalian, **2013** (in Chinese).
(于海波, 博士论文, 大连理工大学, 大连, **2013**.)
- [56] Zhang, X.; Xiao, Y.; Qian, X. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **2008**, 47, 8025.
- [57] Yu, H.; Xiao, Y.; Guo, H.; Qian, X. *Chem. Eur. J.* **2011**, 17, 3179.
- [58] Yu, H.; Xiao, Y.; Guo, H. *Org. Lett.* **2012**, 14, 2014.
- [59] Yuan, L.; Lin, W.; Zhao, S.; Gao, W.; Chen, B.; He, L.; Zhu, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 13510.
- [60] Fu, M.; Xiao, Y.; Qian, X.; Zhao, D.; Xu, Y. *Chem. Commun.* **2008**, 1780.
- [61] Zhou, Y.; Xiao, Y.; Li, D.; Fu, M.; Qian, X. *J. Org. Chem.* **2008**, 73, 1571.

(Qin, X.)