

用于人血清白蛋白检测的有机荧光分子探针的研究进展

吕陶玉赳 朱康宁 刘 斌*

(深圳大学材料学院 深圳 518060)

摘要 人血清白蛋白作为血浆中最丰富的一种蛋白质,在生理过程中有着重要的作用,例如维持血液渗透压、运载小分子配体等。白蛋白在生物样本中的含量能够反映出样本的健康状况,因此标定白蛋白含量在临床疾病诊断中有着很大的用途。随着荧光探针技术的发展,近几年特异性检测血清白蛋白的荧光探针涌现而出。总结了近年来出现的有机荧光分子探针,根据探针的结构、作用机理、光谱特征、检测极限以及探针与白蛋白的结合位点等进行了简要的分类,并由此分析了针对人血清白蛋白的荧光探针的发展趋势与前景。

关键词 人血清白蛋白; 荧光探针; 结合位点; 检测机理

Recent Advances of Organic Fluorescent Probes for Detection of Human Serum Albumin

Lü, Taoyuze^a Zhu, Kangning^a Liu, Bin^{*}

(College of Materials Science and Engineering, Shenzhen University, Shenzhen 518060)

Abstract Human serum albumin (HSA) is the most abundant protein in human blood plasma, which plays important roles in physiological and biological processes, such as keeping the osmotic pressure and transporting small molecular ligands. The level of HSA in biological samples especially in blood serum can reveal several health conditions, and thus, quantitative determination of HSA has vital importance for disease diagnosis. In recent years, as the rapid development of fluorescent probe technique, a great number of fluorescent probes have been reported for sensitive and selective detection of HSA. This article summarizes recent reported organic-based fluorescent probes, subsequently carefully describes the chemical structures, sensing mechanisms, spectral features, limit of detection, and binding sites, and moreover, the future developments and prospects for HSA detection by using fluorescent probes have been discussed.

Keywords human serum albumin; fluorescent probes; binding sites; sensing mechanism

人血清白蛋白(HSA)是人体血浆中含量最为丰富的一种蛋白质,占血浆蛋白质总量的50%以上,HSA的分子量为66.5 kDa,在血液中的寿命半衰期为20 d左右^[1]。HSA在人体内有着许多重要的生理作用,例如结合并转运氨基酸和酯类、抗氧化作用、参与酶催化活动、维持血浆渗透压、参与免疫调节以及运输药物分子等功能^[2,3]。HSA在正常血清中含量为35~50 g/L,其浓度异常通常能够反映出人体内某些生理指标异常,也是心血管类疾病、肝病、糖尿病和肾病等病变的早期标志之一^[4~6]。例如,当HSA在血清中的含量低于35 g/L时,临床上即诊断为低蛋白血症,通常能够反映患者营养不良、肝功能衰竭、肾脏疾病或者术后恢复不佳等生理状

况^[7]。当HSA超过50 g/L时,可能代表慢性脱水和体脂含量异常增高等生理异常状况^[8,9]。因此,精确测定HSA的含量对于特定疾病的预诊断具有极为重要的研究意义。

如图1所示,HSA包含三个球状结构域,共有6个结构亚域(IA、IB、IIA、IIB、IIIA、IIIB^[10])。在这些亚域中,含有两个药物位点(drug sites)^[11],其中药物位点1位于IIA亚域,其疏水空腔能够与许多常见的小分子药物结合,起到输运药物的效果;而药物位点2位于IIIA亚域^[12],其内部空腔除了具有疏水作用外,还含有丰富的氢键供受体^[13],能够与多种药物分子结合,特别是含有羧基或酯基的小分子药物。如表1所示,许多常用的

* Corresponding author. E-mail: bliu@szu.edu.cn

Received March 27, 2019; revised April 26, 2019; published online May 21, 2019.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 21602139).

国家自然科学基金(No. 21602139)资助项目。

小分子药物能够与人血清白蛋白的两个药物位点结合,当药物与白蛋白结合后,其在血浆中的溶解性增加,毒性降低,延缓药物的氧化过程,从而增加药物的作用时间.在研究荧光探针与血清白蛋白的相互作用时还经常用到牛血清白蛋白(BSA)进行分析,这是由于 BSA 与 HSA 是同源蛋白,在结构与氨基酸序列上有着很高的相似性.

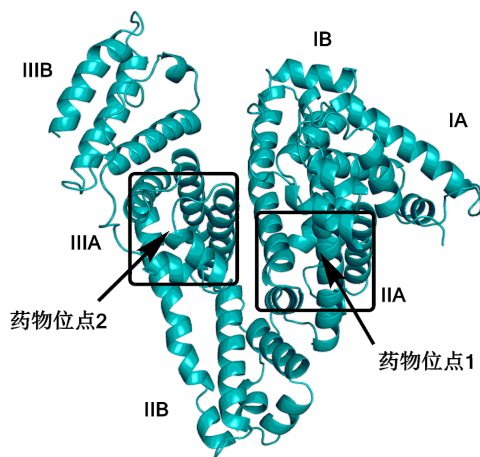


图1 人血清白蛋白 HSA 的结构与结合位点示意图

Figure 1 Structure and binding sites of human serum albumin

目前,医院临床检测 HSA 的方法主要有两种,即免疫测定法^[14]和溴甲酚绿(BCG)比色法^[15].然而,免疫测定法耗费的时间长,流程复杂,不利于 HSA 的实时检测;而 BCG 比色法的测量值具有很强的时间相关性,测试窗口比较短,不利于 HSA 的精确测试.相对以上两种检测方法,荧光探针技术具有响应速度快(秒级)、检测灵敏度高(可达 nmol/L)和操作简单等优点^[16~18].近年来,用于人血清白蛋白检测的有机荧光分子探针技术获得了长足的发展,其检测机理主要依赖探针分子与 HSA 的药物位点特定的结合.如表 2 所示,依据探针分子的荧光响应机理,总结了近年来用于检测 HSA 的有机小分子荧光探针,并重点阐述其作用机理和传感性

能,以供同行参考.

1 环境敏感型荧光探针

环境敏感型荧光探针是一类随着染料分子周围微环境变化(如极性、粘度等)而产生荧光强度或者荧光发射波长变化的光学探针.当这类荧光探针处于极性的水溶液中,染料周围的极性环境使得探针的荧光被猝灭,此时荧光发射强度很弱;一旦水溶液中存在 HSA 分子,由于染料分子和 HSA 内部空腔的次价键相互作用(氢键相互作用、疏水相互作用、 π - π 堆叠等),使得探针分子进入 HSA 的低极性疏水空腔,导致探针荧光发射强度显著增强,或者荧光波长改变,达到检测 HSA 的目的.这类探针设计简单,响应速率快,灵敏度高,因此基于环境敏感型的 HSA 荧光探针文献上报道较多.

1.1 荧光打开型探针

2014 年,樊江莉等^[19]通过双键将二氰甲基烯-4H-色烯与芳香胺连接,合成了探针 **1**,其中氨基作为电子给体,氰基作为电子受体,构成强烈的电子推拉系统,因此展示出对环境极性敏感性.当使用 520 nm 激发, **1** 的水溶液基本无荧光.当加入 HSA 后,荧光急剧增强,加入的 HSA 到达 $0.17 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, **1** 的荧光强度增加了 70 倍,测得 HSA 的检测极限为 $22.0 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$.更重要的是,探针 **1** 对 HSA 的响应显著高于 BSA 的响应,这一特性可用于分辨 HSA 和 BSA.经分子对接模拟发现, **1** 结合于药物位点 1,它的氨基和氧原子与氨基酸残基 Arg218、Arg257 的胍基形成了两个氢键,对体系稳定性有很大贡献.

2016 年,葛广波等^[20]基于三氰基二氢呋喃(TCF)衍生物合成了一种能快速响应的荧光探针 **2**.实验表明 **2** 结合了 HSA 的非药物位点,各类药物的存在不会影响到 **2** 的检测准确性;后续又通过分子对接模拟计算推断出 **2** 结合后位于 IB 亚域,其中 π - π 相互作用与疏水性起

表1 常用药物位点抑制剂
Table 1 Inhibitors for drug binding sites

药物名	结合位点	用途
华法林	位点 1	体内维生素 K 拮抗剂,抗凝血,防治血栓栓塞性疾病
保泰松	位点 1	消炎镇痛,用于风湿性和类风湿性关节炎
羟基保泰松	位点 1	消炎镇痛,用于风湿性和类风湿性关节炎
吲哚美辛	位点 1	解热镇痛,消炎,抗风湿
水杨酸	位点 1	消毒防腐
二碘代水杨酸	位点 1	医药中间体
胆影酸	位点 1	诊断用药,用于胆囊、胆管造影
阿扎丙酮	位点 1	消炎药物、促尿酸排泄
布洛芬	位点 2	解热镇痛、消炎、抗风湿性关节炎
双氯芬酸	位点 2	解热镇痛、抗风湿性关节炎

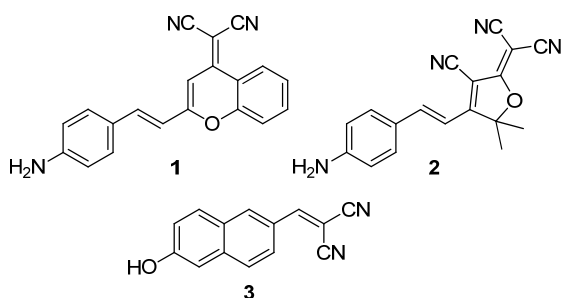
表 2 荧光探针基本信息
Table 2 Basic information of the probes

编号	响应方式	发射峰变化/nm	检测极限/($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	响应时间	结合位点	检测环境	参考文献
1	Turn-on	620↑	170	—	位点 1	血浆	[19]
2	Turn-on	612↑	2.5	3 s	IB 亚域	血浆、培养上清液	[20]
3	Turn-on	562↑	0.05	—	位点 1、位点 2	血浆、尿液	[21]
4	Turn-on	680↑	0.73	—	位点 1	血浆	[22]
5	Turn-on	680↑	1.73	5 s	位点 1	血浆、尿液	[23]
6	Turn-on	524↑	1.91	—	位点 1、IB 亚域	血浆	[24]
7	Turn-on	508↑	0.3	1 h	位点 1、位点 2	血浆、尿液、细胞	[25]
8	Turn-on	465↑	3.3	10 s	位点 1	血浆、尿液、细胞	[26]
9d	Turn-on	480↑	0.09	—	疏水位点	(BSA)血浆、凝胶	[27]
10a	Turn-on	508↑	6.24	<30 s	—	HSA 溶液	[28]
10b	Turn-on	517↑	25.22	—	—	HSA 溶液	[28]
11	Turn-on	535↑	0.57	<1 min	位点 1	健康人、患者血清样本	[29]
12	Turn-on	584↑	0.000199	—	位点 1	血浆	[30]
13	Turn-on	585↑	0.0015	<1 min	位点 1	血浆、尿液	[31]
14	Turn-on	590↑	0.3	—	脂肪酸位点 1	血浆、尿液	[32]
15	Turn-on	475↑	0.067	—	中部狭长空腔	人工尿液、凝胶	[33]
16	Turn-on	525↑	—	—	疏水相互作用	BSA 溶液	[34]
17	Turn-on	443↑	1.68	6 s	疏水位点	血浆	[35]
18	Turn-on	517↑	6.11	—	中部狭长空腔	血浆	[36]
19	Turn-on	480↑	0.122	—	位点 1	血浆	[37]
20	Turn-on、比率法	733↓; 655↑	1.26	—	位点 1	血浆、尿液、细胞	[38]
21	Turn-on、比率法	763↓; 688↑	3.17	—	位点 1	(BSA)血浆	[39]
22	Turn-on、比率法	500↓; 490↑	0.4	—	非药物位点	血浆、尿液	[40]
23	Turn-on、比率法	400↓; 454↑	0.27	2 h	疏水位点	血浆、尿液、唾液	[41]
24	Turn-on、比率法	476↓; 461↑	0.48	—	位点 1、位点 2	(BSA)溶液、细胞内	[42]
25	Turn-on、比率法	700↓; 480↑	0.2	—	Cys34 硫醇基团	血浆	[44]
26	Turn-on	674↑	9.24	—	位点 2	血浆、细胞	[45]
27	Turn-on	610↑	0.18	<5 min	位点 1	HSA 溶液	[46]
28	Turn-on	480↑	9300	—	位点 1	血浆	[47]
29	比率法	490↓; 380↑	1.64	1 min	—	血浆	[48]
30	Turn-on、比率法	585↓; 596↑	0.43	数秒	非药物位点	血浆、体液、人工尿液	[49]
31	比率法	577↓; 540↑	0.02	—	位点 1	血浆、尿液、细胞	[50]
32	Turn-on、比率法	585↓; 540↑	0.21	<15 min	位点 1、位点 2	血浆、细胞内	[52]
33	Turn-on、比率法	600↓; 662↑	6.51	—	反应位点	血浆、细胞内	[53]
34	比率法	416↓; 564↑	2.5	<20 min	反应位点	血浆、培养上清液、细胞内	[54]

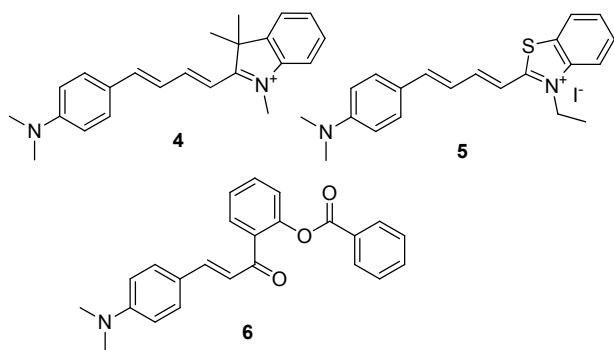
到了关键作用. 在 pH 值为 8.0 的情况下 **2** 与 HSA 结合后, 在 560 nm 处激发得到位于 612 nm 的很强的发射峰, 并且展示出较长的荧光寿命. **2** 对于 HSA 的检测极限为 $2.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 响应时间为 3 s. 实验表明, **2** 可用于细胞培

养上清液的 HSA 检测标定. 随后他们^[21]将丙二酐与羟基基共轭连接, 组成了高敏感度 HSA 荧光探针 **3**, 在 482 nm 处激发得到位于 562 nm 的发射峰. 在加入 HAS ($100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)后, **3** 的荧光增强了 360 多倍, 检测极限达

到了 $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 可以用于标定尿液. 置换实验以及分子对接模拟都显示, **3** 能够同时与 HSA 的两个药物位点结合.

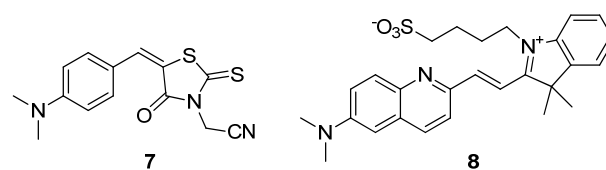


Kumar 等^[22]基于扭曲的分子内电荷转移(TICT)效应设计了一种对 HSA 高特异性响应的荧光探针 **4**, 与樊江莉等一样, 他们发现探针 **4** 对 HSA 的响应要显著高于对牛血清白蛋白(BSA)的响应. 当 **4** 单独存在于溶剂中时, 由于 TICT 效应导致荧光极其微弱; 但当其与 HSA 的药物位点 1 结合后, 限制了 **4** 的 TICT 效应, 荧光发射强度显著增强, 其检测极限(LOD)为 11 nmol/L ($0.73 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). 在 550 nm 的激发波长下 **4** 可以获得 680 nm 的发射波长, 这类近红外发射对于生物检测具有很大的优势. 在此同时, 彭孝军等^[23]使用相似的结构, 通过将共轭乙烯基连接到半菁染料上, 设计出一种近红外荧光探针 **5**. **5** 与 HSA 结合于药物位点 1, 580 nm 激发下产生 680 nm 的发射峰, 检测极限为 $1.73 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 并且响应时间很短, 约 5 s 左右. 实验表明 **5** 可以在尿液中定量特异性检测 HSA, 可以作为肾衰竭、糖尿病肾病、肝损伤和脓毒症的预报探针. 崔京南等^[24]也基于 TICT 效应合成了探针 **6**. 在 PBS 缓冲液中以 436 nm 激发, 得到位于 524 nm 的微弱的发射峰; 当加入 HSA 后, 发射荧光增强, 检测极限为 $1.91 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. 通过置换实验以及分子对接模拟得出, **6** 结合于 HSA 的药物位点 1 以及位于 IB 亚域的空腔.

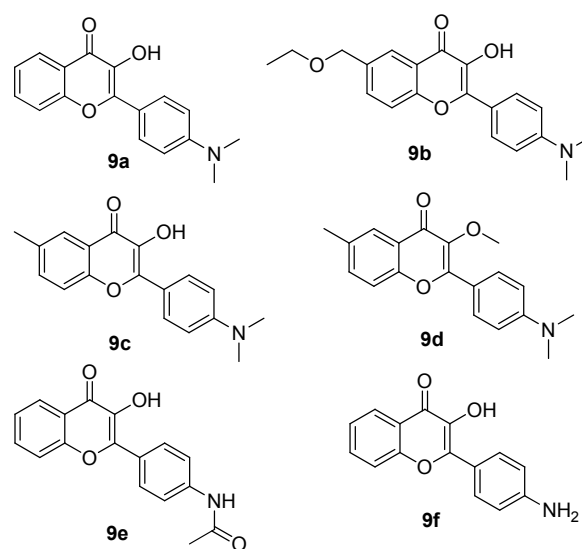


2018 年, 朱海亮等^[25]通过计算机算法筛选出荧光探针 **7**, 能够同时与两个药物位点结合. 在磷酸盐缓冲

液(PBS)中, 使用 436 nm 激发时, **7** 的发射峰位于 508 nm ; 加入 $15 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 HSA 后, **7** 的荧光增强了 700 多倍, 对 HSA 的检测极限为 $0.3 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 可以做细胞成像. 在此之后, 该组^[26]利用喹啉环与吡啶环合成探针 **8**, 可以作为细胞成像探针. **8** 自身的荧光微弱, 而当加入 $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 HSA 后, **8** 在 465 nm 处荧光增强了 500 倍, 它的检测极限为 $3.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 且有着良好的响应时间, 与 HSA 混合 10 s 内能得到稳定荧光. 经分子对接模拟发现, **8** 位于药物位点 1, 能够与氨基酸残基 Arg218 产生氢键, 与 Lys195 产生阳离子- π 相互作用.

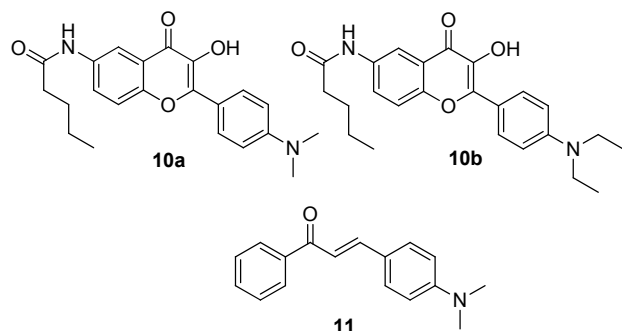


十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)是分析蛋白质的重要手段, 其中十二烷基硫酸钠(SDS)能够对蛋白染色剂有干扰. Pang 等^[27]基于黄酮设计了一系列 BSA 荧光探针 **9a~9f**, 可以在真实血清样本以及聚丙烯酰胺凝胶中检测白蛋白. 由于激发态分子内质子转移(ESIPT), **9** 的荧光光谱存在两个峰, 且展示出环境敏感特性. 当加入 BSA 后, **9** 的荧光显著增强, **9a~9f** 对 BSA 的检测极限分别为: 2.6 、 0.14 、 0.59 、 0.09 、 14 、 $3.4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. **9b~9d** 的实验结果表明, 6 号位点烷基的存在对黄酮与水或蛋白质的相互作用有很大影响, 且实验表明 **9d** 可成功用于检测凝胶中的 BSA.

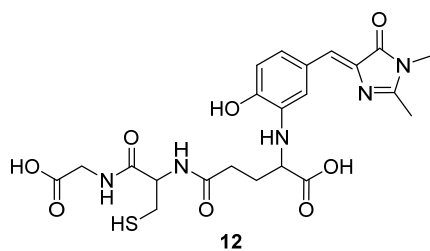


2016 年, 刘斌等^[28]基于黄酮衍生物设计了荧光探针 **10a**、**10b**, 通过增加氢键供受体来使探针分子与 HSA 间的结合更加紧密. 实验中, **10a** 与 **10b** 在无 HSA 时基本无荧光; 而当加入 1 equiv. HSA 后, **10a** 在 508 nm 处

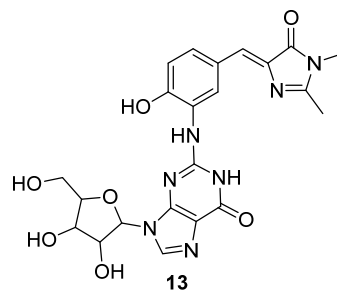
的发射峰展示出了 320 倍的荧光增强, **10b** 在 517 nm 处的发射峰展示出 75 倍的荧光增强, 检测极限分别为 94 ($6.24 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 与 380 nmol/L ($25.22 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$). 在 **10a** 与 BCG 用比色法分别测定 HSA 的对比试验中得知, **10a** 的响应时间较为迅速, 30 s 内即可达到最大荧光. 2018 年, 该课题组^[29]使用查尔酮衍生物, 基于 D- π -A 结构设计合成了位点 1 探针 **11**, 有约 130 nm 的斯托克斯位移, 可以有效防止荧光自吸收. 当加入 1 equiv. 的 HSA 后, **11** 位于 535 nm 的发射峰逐渐增加, 检测极限为 $0.57 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 且响应迅速, 在 1 min 内即可得到稳定荧光. 实验还证明该探针能够在健康人血清样本与低白蛋白血症患者血清样本中定量测定 HSA 的浓度.



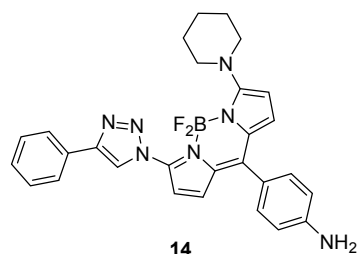
2016 年, 肖丹等^[30]基于绿色荧光蛋白(GFP)生色团衍生物设计合成了探针 **12**, 激发波长为 425 nm 时发射峰位于 584 nm. 当 HSA 浓度为 $530 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, **12** 的荧光强度增加了 43 倍, 测得检测极限为 $198.6 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$. 在此基础上, 该课题组^[31]为继续探究 GFP 类探针而改进了原有探针, 通过向 GFP 生色团引入了鸟嘌呤核苷合成出探针 **13**, 其响应时间在 1 min 内. 在没有 HSA 时, 其吸收峰位于 425 nm; 当 HSA 浓度逐步增加时, **13** 的吸收峰逐渐位移至 430 nm 处, 此时发射峰为 585 nm, 荧光增强了 27 倍, 对 HSA 的检测极限为 $15.09 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$. 加入 HSA 位点的抑制剂实验表明 **13** 结合于 HSA 的药物位点 1, 当 **13** 与位点 1 结合后, 染料周围环境转变为疏水低极性, 同时刚性环境限制了 **13** 的振动, 使其非辐射能量损失减少, **13** 的荧光发射增强, 达到检测 HSA 的目的.



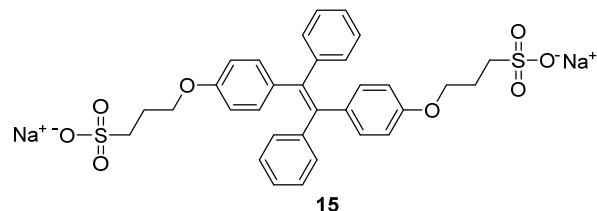
通常氟硼二吡咯(BODIPY)染料的斯托克斯位移相对较小, 因此会产生诸多局限性, 例如荧光自猝灭, 而



Vendrell 等^[32]基于 BODIPY 类衍生物设计的探针 **14** 却存在较大的斯托克斯位移: 在 DMSO 中 **14** 的吸收峰位于 472 nm, 发射峰位于 590 nm, 有约 120 nm 的斯托克斯位移. 当与 HSA 结合后, **14** 展示出 220 倍的荧光增强, 检测极限为 $0.3 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 且发射光谱略有蓝移. 他们的研究结果发现 **14** 并非结合于 HSA 药物位点, 而是脂肪酸位点 1 (FA1).

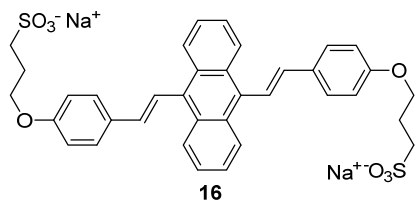


具有聚集诱导荧光(AIE)特性的荧光团也被用于检测 HSA 的研究. 2010 年, 唐本忠等^[33]基于四苯乙烯(TPE)衍生物设计了水溶性探针 **15**, 在 PBS 缓冲液中的荧光极其微弱. 当逐步加入 HSA 后, **15** 的 475 nm 处的荧光迅速增强, 在加入 $1 \text{ } \mu\text{mol/L}$ 的 HSA 后, 其荧光强度趋于定值; 加入 $10 \text{ } \mu\text{mol/L}$ 的 HSA 后, **15** 的荧光强度增强了约 300 倍, 其检测极限为 1 nmol/L . 通过分子对接模拟得出, 结合后 **15** 位于 IIIA、IB、IIA 之间的疏水空腔. 在人工尿液中证明了 **15** 对 HSA 的检测性, 并且该探针还可作为 PAGE 分析中的蛋白质染色试剂.

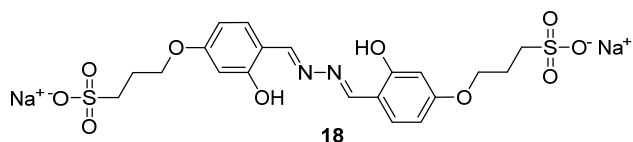
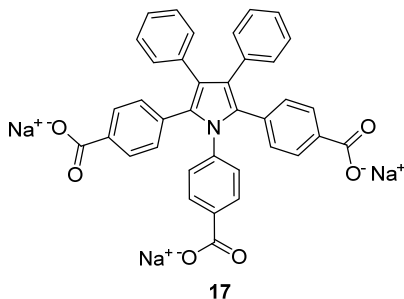


2013 年, 田文晶等^[34]利用葱的衍生物设计了水溶性 AIE 型 BSA 探针 **16**. 该探针在磷酸缓冲液(pH=7)中无荧光, 然而当逐步滴加 BSA 后, 其荧光逐渐产生, 当 BSA 浓度达到 $70 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, **16** 位于 525 nm 处的发射峰增强了 600 倍, 且当 BSA 浓度位于区间 $0 \sim 60 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内时, **16** 的荧光与 BSA 浓度呈现线性相关, 因

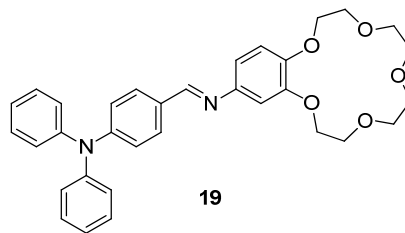
此可直观地反映出白蛋白浓度. 后续经数据分析与理论推导得出, **16** 与 BSA 间主要为疏水相互作用.



2015 年, 董宇平等^[35]合成了一种能够产生 AIE 效应的 1,2,5-三苯基吡咯(TPP)衍生物探针 **17**, 在与 HSA 通过疏水作用结合后产生聚集增强辐射(AEE)效应: **17** 在 PBS 缓冲液中溶解后, 使用 310 nm 波长激发后得到发射峰值为 443 nm, 荧光强度非常小; 当加入浓度为 $150 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 BSA 时, 荧光增强为原来的 9 倍. **17** 对 BSA 的检测极限为 $2.18 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 对 HSA 的检测极限为 $1.68 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 并且响应时间很短, 与 HSA 混合 6 s 后能得到稳定的荧光. 2017 年, 胡君等^[36]设计了 AIE 型荧光探针 **18**. N—N 键的旋转使 **18** 的荧光在溶液中猝灭. 当在 355 nm 处激发 **18**, 得到 517 nm 的微弱荧光. 当加入 0.2 mg 的 HSA 后, **18** 的荧光增强了 17 倍, 其检测极限为 $6.11 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. 经分子对接显示, **18** 并未结合于药物位点 1、2, 而是位于 HSA 中间部位的狭长空腔中. 氨基酸残基 Arg186、Arg218、Asp451 能够与 **18** 形成氢键, 而 Tyr452、Val455、Lys195、Ala191、Lys190、Glu425 与 **18** 有疏水相互作用, 从而限制了 **18** 的旋转.

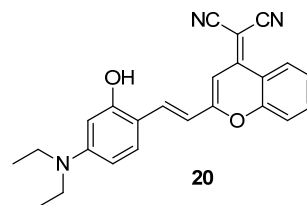


杨昌英等^[37]基于席夫碱与冠醚合成了探针 **19**. **19** 的荧光在 PBS 缓冲液中被猝灭, 而当加入 $5 \mu\text{mol/L}$ 的 HSA 后, 其荧光增强了 32 倍. **19** 在 PBS 缓冲液中对 HSA 的检测极限为 $0.122 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 在尿液中检测极限为 $1.95 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. 置换实验表明其结合于药物位点 1, 进一步经分子对接模拟分析得知, **19** 与氨基酸残基 Trp214 形成 π - π 相互作用, 与 His242 形成氢键.

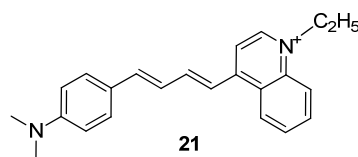


1.2 比率型荧光探针

Govindaraju 等^[38]以二氰甲基-4-氢-色烯为基础设计了红光-近红外探针 **20**, 具有推拉结构的 π 电子系统. 在 PBS 缓冲液中吸收峰为 530 nm, 得到的发射峰为 733 nm, 极其微弱; 当 HSA 的浓度为 $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, **20** 结合于药物位点 1, 展示出 100 倍的荧光增强, 且伴随着发射峰从 733 nm 到 655 nm 的蓝移. **20** 对 HSA 的检测极限为 $1.26 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 可作为正常血浆样品以及尿液样品的检测探针, 经实验得知 **20** 还可作细胞成像.

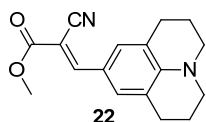


Pal 等^[39]利用苯乙烯基荧光分子 LDS-798 作为近红外探针 **21**, 使用 BSA 进行实验. 由于 TICT 效应, 在水溶液中 **21** 展示出微弱的荧光, 吸收峰位于 500 nm, 发射峰位于 763 nm; 当加入 BSA 后, **21** 结合于 BSA 的药物位点 1, 它的吸收峰红移了 40 nm, 而发射峰蓝移了 75 nm, 对 BSA 的检测极限为 48 nmol/L ($3.17 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$).

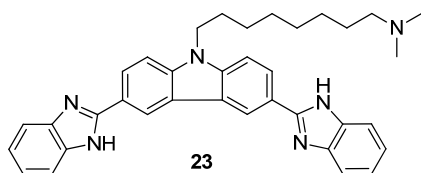


陈贵通等^[40]基于分子转子设计合成了一种粘度敏感型探针 **22**, 能够结合于 HSA 非药物位点. 当与 HSA 的疏水空腔结合时, **22** 的旋转受阻, 减少了能量损失, 因此极大地增强了荧光强度. 未添加 HSA 时, **22** 的吸收峰位于 464 nm, 发射峰位于 500 nm; 而加入 HSA 后, **22** 的吸收峰和发射峰分别位移至 456 和 490 nm, 其对 HSA 的检测极限为 $0.4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. 虽然 **22** 的荧光光谱与尿液的背景荧光相似, 但在和免疫测定法进行尿液检测的对比实验中, **22** 仍然展示出尿液环境检测 HSA 的可能性.

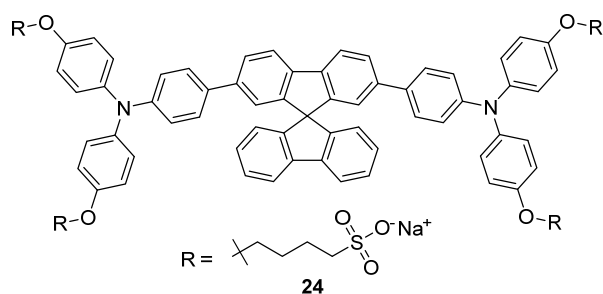
Bhattacharya 等^[41]以运动导致荧光发射变化(MICE)效应为依据合成了一种具有 AIE 效应的荧光探针 **23**. 在



水中能聚集荧光,并展示出优良的热稳定性和 pH 敏感性.处于分散状态时,由于 **23** 的自由度很大,激发态电子易通过非辐射跃迁回到基态.在溶液 pH 为 7.4,温度为 37℃ 的情况下, **23** 显示出单体发射峰,位于 400 nm.当加入 HSA 后,部分单体探针结合到了 HSA 的疏水位点,荧光从蓝色逐渐变为青色,光谱红移至 454 nm,检测极限为 $0.27 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$.



Rizzo 等^[42]使用螺二苈衍生物作为 BSA 荧光探针 **24**,有良好的水溶性以及较大斯托克斯位移等特点. **24** 的吸收峰位于 280 和 380 nm,加入 BSA 后,在紫外灯照射下, **24** 的发射光谱明显蓝移,检测极限为 $7.3 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($0.48 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$).研究表明 **24** 能结合 BSA 的两个药物位点,但与药物位点 1 结合性更好.

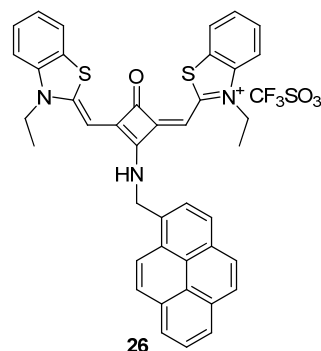
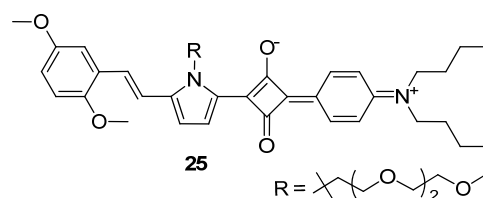


2 聚集-解聚型荧光探针

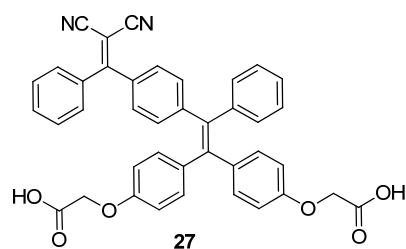
HSA 可促使探针分子聚集体解聚而产生荧光信号.探针分子在单体状态时具有荧光,当该分子聚集成团后,由于分子间的 $\pi-\pi$ 堆叠,导致聚集荧光猝灭(ACQ)效应^[43],使荧光猝灭;当体系中存在 HSA 后,由于 HSA 疏水空腔的次价键相互作用等令聚集态探针分子解聚集,原有荧光被重新打开,达到 HSA 定量检测的目的.

2014 年, Ajayaghosh 等^[44]以方酸衍生物与硫醇的反应入手,首次设计了能够自组装解聚的 HSA 荧光探针 **25**. **25** 溶液的吸收峰为 670 nm,发射峰为 700 nm;在不断加入 HSA 后, 670 nm 处的吸收峰逐渐降低,位于 380 nm 的新吸收峰逐渐增强,在此吸收峰激发时,发射峰位于 480 nm. **25** 在水溶液中自组装形成平均直径为 200 nm 的纳米球,由于 ACQ 效应导致荧光猝灭;当环境中

存在 HSA 或 BSA 时,其疏水空腔能将 **25** 包裹在内,使 **25** 解聚,并与蛋白质 34 号残基半胱氨酸(Cys34)的硫醇基团发生亲核反应.该反应破坏了 **25** 原有的共轭体系,产生新的荧光团,并能发出强烈的绿色荧光,对 BSA 与 HSA 的检测极限为 3 nmol/L ($0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$).2016 年徐勇前等^[45]改进了上述工作,将方酸荧光团与苊连接合成探针 **26**,以通过苊增强探针的 $\pi-\pi$ 相互作用与 CH- π 相互作用,使方酸聚集体更加稳定,因此可被应用于活细胞内生物成像. **26** 聚集体与单体探针分子的吸收峰分别位于 610 和 668 nm;当加入 HSA 后, 610 nm 处的吸收峰降低, 668 nm 处吸收峰升高. 600 nm 激发时, **26** 在水溶液中由于 ACQ 效应基本无荧光;当加入 HSA 时, 674 nm 处的荧光逐渐增加,在加入 $16 \mu\text{mol/L}$ 的 HSA 后, **26** 荧光强度增强了 38 倍,其对 HSA 的检测极限为 140 nmol/L ($9.24 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$).



2016 年,赵睿等^[46]使用四苯基乙烯(TPE)衍生物基于 AIE 效应设计了水溶性荧光探针 **27**,为了增强探针的特异性与结合力,在 TPE 骨架上增加了两个羧基.该探针在溶液中自发组装成平均直径 34 nm 的纳米球,基本无荧光;而加入 HSA 后, 5 min 内纳米球解聚至 6 nm,探针分子 **27** 进入 HSA 药物位点 1,在紫外灯照射下发出 610 nm 的红光信号,整个过程发生迅速,检测极限为 2.7 nmol/L .



2017年,程震与曾文彬等^[47]以咪唑为荧光团,吡啶盐基团为亲水团,通过对疏水链长度进行调整,筛选出一种两亲性自组装探针 **28**,它在水溶液中自组装为180 nm 平均直径的微粒.在水溶液用380 nm 激发无荧光;当加入HSA后,**28**结合于药物位点1,小部分与位点2结合,使得480 nm 处荧光剧烈增加,最终测得**28**的检测极限为 $9.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.次年,丁立平等^[48]同样通过两亲性分子设计探针分子,使用两亲性胆酸修饰苝的衍生物设计出探针 **29**.在水溶液中**29**会聚集成平均直径为150 nm 的纳米球,此时其吸收峰位于284和355 nm,当加入HSA后,激基缔合物光谱减弱,单体发光增强.**29**对于HSA的检测极限为 $1.64 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,然而其对HSA的特异性相对一般.

2018年, Das 等^[49]设计了一种能够自组装的 TICT 荧光探针 **30**,数秒内可对HSA做出响应.**30**在PBS缓冲液中可以形成直径平均200 nm 的球状颗粒;而在水溶液中,**30**的吸收峰为567 nm,当用540 nm 激发后,得到位于585 nm 的发射峰,由于TICT效应,其荧光很微弱.当加入HSA后**30**的吸收峰红移至575 nm 处,发射峰红移至596 nm,荧光增强了30倍,其检测极限为 6.5 nmol/L ($0.43 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$).且置换实验表明,**30**结合于HSA的非药物位点,后续经分子对接模拟发现,氨基酸残基Lys436B能够与**30**形成氢键,增强稳定性.

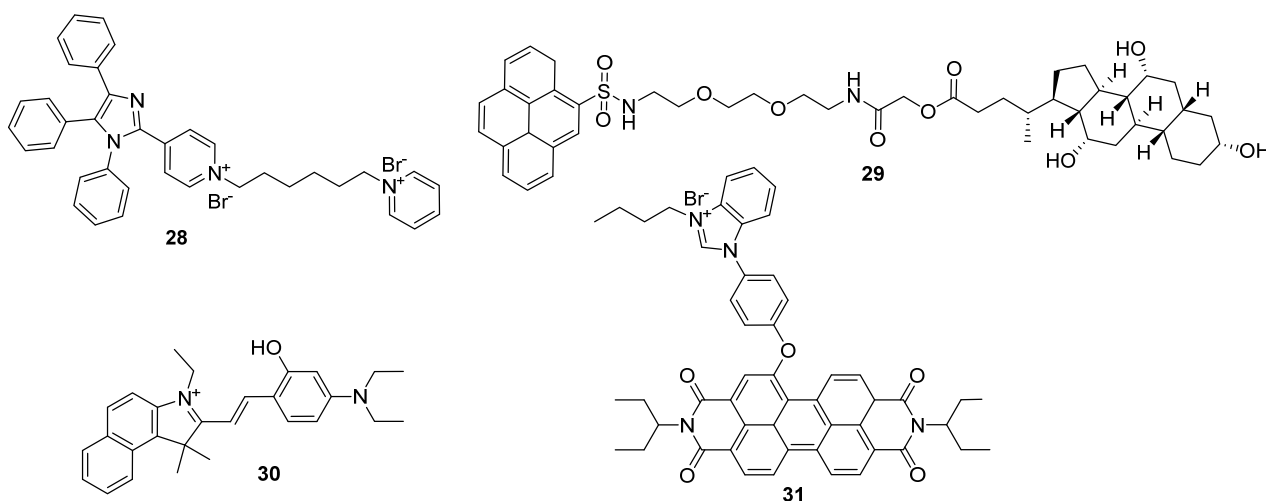
同年, Singh 等^[50]使用茈二酰亚胺(PDI)衍生物制造了荧光探针 **31**,可用作细胞示踪成像.**31**在4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)缓冲液中发生自组装,展示出位于500 nm 的吸收峰以及位于577 nm 的微弱荧光.加入少量HSA或BSA后,**31**结合于HSA的药物位点1,其577 nm 的发射强度降低;但继续加入HSA或BSA后,**31**的发射峰蓝移至540 nm 处,其对于HSA的检测极限为 0.3 nmol/L ($0.02 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$).

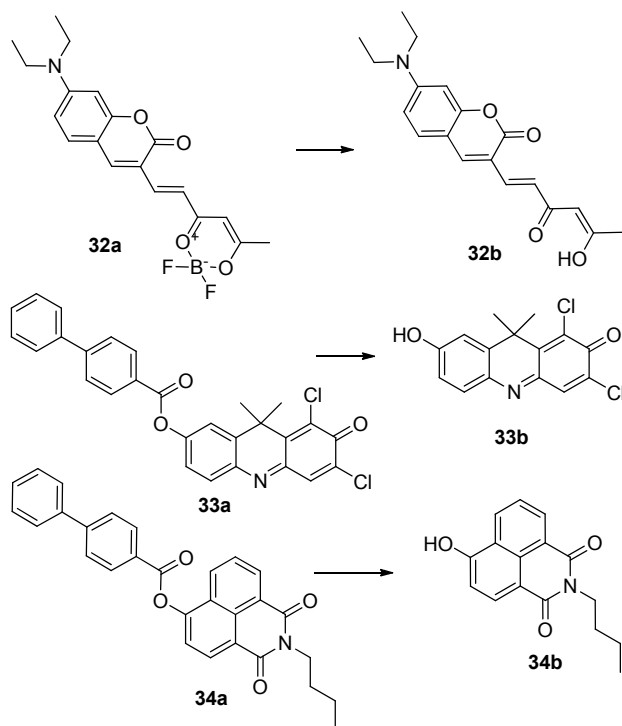
3 酶促反应型荧光探针

HSA有类似酶的功能,主要具有假酯酶活性^[51].底物与HSA发生水解反应,在酯基位点断裂形成羟基与酰基,导致羟基端成为游离的荧光分子,而酰基端连接于HSA的氨基酸残基(例如赖氨酸、酪氨酸).通过酶促反应可设计出多种特异性荧光探针.

钱俊红等^[52]基于香豆素与三氟化硼的络合物合成了探针 **32a**,其水解产物为**32b**,该探针与HSA的结合非常稳定,位点特异药物难以将其置换.在PBS缓冲液中,**32a**的吸收峰为515 nm,没有荧光;而当额外有 $1.0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的HSA存在时,**32a**位于515 nm 的吸收峰减小,且新吸收峰逐渐出现在475 nm;其发射峰位于585 nm,且540 nm 处有一肩峰.在与HSA混合1 min后,HSA促进了**32a**水解成具有更短共轭结构的**32b**,540 nm 峰迅速增加,在15 min内**32b**的荧光增强了1000倍,检测极限为 $0.21 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.运用分子对接模拟表明,**32a**与药物位点1的Arg257形成两个氢键,疏水作用也起到了稳定作用,在位点2也可形成氢键与疏水相互作用.

杨凌等^[53]基于7-羟基吩恶酮(DDAO)设计了探针 **33a**.**33a**自身在PBS缓冲液中吸收峰为430 nm,发射峰位于600 nm,荧光强度极低.当加入HSA后,由于水解反应使**33a**生成**33b**,原吸收峰减弱,新吸收峰出现在646 nm 处,发射峰逐渐出现在662 nm 处,检测极限为 $6.51 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.与此同时,该课题组^[54]基于茈二酰亚胺合成了类底物探针 **34a**,与HSA反应后生成**34b**,可做活体肾细胞重吸收HSA的双光子成像.在PBS-乙氰($V:V=1:1$)溶液中,**34a**的吸收峰位于342 nm,发射峰位于416 nm;当加入 $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的HSA后,产生了位于452 nm 处的新吸收峰,发射峰红移至564 nm 处,与**34b**的光谱特征一致,其对于HSA的检测极限为 $2.5 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.





4 总结与展望

近几年随着荧光探针技术的不断发展,对 HSA 检测的特异性不断增强,灵敏度稳步提升.在不断发展血浆 HSA 探针的同时,也出现了检测尿液、细胞内等生物样本中 HSA 含量的荧光探针.上述三类探针在性能上有着各自的优势,同时,现有的荧光探针仍有诸多待解决的问题.环境敏感型探针有着灵敏度高、响应时间短等特点,且该类探针与 HSA 位点等比例结合,容易从荧光强度中推出 HSA 浓度.但由于环境敏感型探针位点的过度单一化,以药物位点 1 结合探针为主,导致血清样本中的某些药物分子可与荧光探针竞争 HSA 位点,使检测结果受到较大影响,同时该类型探针容易受到溶液环境(如粘度、极性等)的影响.聚集-解聚类探针由于在溶液中的 ACQ 效应,背景荧光极低,然而其荧光响应非常依赖聚集态的颗粒大小与形状,导致测试结果重复性较差,因此其制备、存储有着很大的困难.酶促反应型探针的检测特异性极高,但其响应时间较慢,荧光强度随时间变化,且对于检测环境(温度、pH 等)敏感,不利于实际临床检测.

综上所述,需要通过优化分子设计,筛选合成快捷、成本低廉、储存运输方便的荧光探针分子体系,提高荧光探针对 HSA 的特异检测能力,减少血清样本中其他共存的生物分子对检测的影响,同时,需要与医院血检部门合作,进行高通量大样本多病例的血清样品检测,以评估现有荧光探针体系的临床应用效果.

References

- [1] Friedrichs, B. J. M. N.; Research, F. **2010**, *41*, 382.
- [2] Kragh-Hansen, U.; Chuang, V. T. G.; Otagiri, M. *Biol. Pharm. Bull.* **2002**, *25*, 695.
- [3] Quinlan, G. J.; Martin, G. S.; Evans, T. W. *Hepatology* **2005**, *41*, 1211.
- [4] Viberti, G. C.; Hill, R. D.; Jarrett, R. J.; Argyropoulos, A.; Mahmud, U.; Keen, H. *Lancet* **1982**, *1*, 1430.
- [5] Mogensen, C. E.; Hansen, K. W.; Osterby, R.; Damsgaard, E. M. *Diabetes Care* **1992**, *15*, 1192.
- [6] Hoogenberg, K.; Sluiter, W. J.; Dullaart, R. P. F. *Acta Endocrinol.* **1993**, *129*, 151.
- [7] Murch, S. H.; Winyard, P. J.; Koletzko, S.; Wehner, B.; Cheema, H. A.; Risdon, R. A.; Phillips, A. D.; Meadows, N.; Klein, N. J.; Walker-Smith, J. A. *Lancet* **1996**, *347*, 1299.
- [8] Li, W.; Chen, D.; Wang, H.; Luo, S.; Dong, L.; Zhang, Y.; Shi, J.; Tong, B.; Dong, Y. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7*, 26094.
- [9] Yu, Y.; Huang, Y.; Hu, F.; Jin, Y.; Zhang, G.; Zhang, D.; Zhao, R. *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 6374.
- [10] Dockal, M.; Carter, D. C.; Ruker, F. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 29303.
- [11] Bhattacharya, A. A.; Grune, T.; Curry, S. *J. Mol. Biol.* **2000**, *303*, 721.
- [12] Liu, H.; Bao, W.; Ding, H. J.; Jang, J. C.; Zou, G. L. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 12938.
- [13] He, X. M.; Carter, D. C. *Nature* **1992**, *358*, 209.
- [14] Doyle, M. J.; Halsall, H. B.; Heineman, W. R. *Anal. Chem.* **1982**, *54*, 2318.
- [15] Doumas, B. T.; Watson, W. A.; Biggs, H. G. *Clin. Chim. Acta* **1971**, *31*, 87.
- [16] Jiao, C.; Liu, Y.; Lu, W.; Zhang, P.; Wang, Y. *Chin. J. Org. Chem.* **2019**, *39*, 591 (in Chinese).
(矫春鹏, 刘媛媛, 路文娟, 张平平, 王延凤, 有机化学, **2019**, *39*, 591.)
- [17] Li, Z.; Huo, Y.; Yang, X.; Ji, S. *Chin. J. Org. Chem.* **2016**, *36*, 2317 (in Chinese).
(李宗植, 霍延平, 阳香华, 籍少敏, 有机化学, **2016**, *36*, 2317.)
- [18] Chen, Z.-Z.; Zhang, N.; Zhang, W.-S.; Tang, B. *Chin. J. Anal. Chem.* **2006**, 1341 (in Chinese).
(陈蓁蓁, 张宁, 张文申, 唐波, 分析化学, **2006**, 1341.)
- [19] Fan, J. L.; Sun, W.; Wang, Z. K.; Peng, X. J.; Li, Y. Q.; Cao, J. F. *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 9573.
- [20] Wang, Y. R.; Feng, L.; Xu, L.; Li, Y.; Wang, D. D.; Hou, J.; Zhou, K.; Jin, Q.; Ge, G. B.; Cui, J. N.; Yang, L. *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 6064.
- [21] Wang, Y. R.; Feng, L.; Xu, L.; Hou, J.; Jin, Q.; Zhou, N.; Lin, Y.; Cui, J. N.; Ge, G. B. *Sens. Actuator, B* **2017**, *245*, 923.
- [22] Reja, S. I.; Khan, I. A.; Bhalla, V.; Kumar, M. *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 1182.
- [23] Li, H. D.; Yao, Q. C.; Fan, J. L.; Du, J. J.; Wang, J. Y.; Peng, X. J. *Dyes Pigm.* **2016**, *133*, 79.
- [24] Li, P. B.; Wang, Y. R.; Zhang, S. F.; Xu, L.; Wang, G. C.; Cui, J. N. *Tetrahedron Lett.* **2018**, *59*, 1390.
- [25] Xu, Y. J.; Su, M. M.; Li, H. L.; Liu, Q. X.; Xu, C.; Yang, Y. S.; Zhu, H. L. *Anal. Chim. Acta* **2018**, *1043*, 123.
- [26] Xu, Y. Q.; Zhang, M.; Li, B. Y.; Wang, W.; Wang, B. Z.; Yang, Y. S.; Zhu, H. L. *Talanta* **2018**, *185*, 568.
- [27] Liu, Y.; Pang, B.; Bouhenni, R.; Duah, E.; Paruchuri, S.; McDonald, L. *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 11060.
- [28] Liu, B.; Bi, X. M.; McDonald, L.; Pang, Y.; Liu, D. Q.; Pan, C. J.; Wang, L. *Sens. Actuator B-Chem.* **2016**, *236*, 668.
- [29] Luo, Z. J.; Liu, B.; Zhu, K. N.; Huang, Y. Y.; Pan, C. J.; Wang, B. F.; Wang, L. *Dyes Pigm.* **2018**, *152*, 60.
- [30] Liao, C. Y.; Li, F. F.; Huang, S. S.; Zheng, B. Z.; Du, J.; Xiao, D. *Biosens. Bioelectron.* **2016**, *86*, 489.
- [31] Huang, S. S.; Li, F. F.; Liao, C. Y.; Zheng, B. Z.; Du, J. A.; Xiao, D. *Talanta* **2017**, *170*, 562.

- [32] Er, J. C.; Tang, M. K.; Chia, C. G.; Liew, H.; Vendrell, M.; Chang, Y. T. *Chem. Sci.* **2013**, *4*, 2168.
- [33] Hong, Y. N.; Feng, C.; Yu, Y.; Liu, J. Z.; Lam, J. W. Y.; Luo, K. Q.; Tang, B. Z. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 7035.
- [34] Wang, Z. L.; Ma, K.; Xu, B.; Li, X.; Tian, W. J. *Sci. China: Chem.* **2013**, *56*, 1234.
- [35] Li, W. Y.; Chen, D. D.; Wang, H.; Luo, S. S.; Dong, L. C.; Zhang, Y. H.; Shi, J. B.; Tong, B.; Dong, Y. P. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7*, 26094.
- [36] Li, J. Z.; Wu, J. D.; Cui, F. C.; Zhao, X.; Li, Y. Q.; Lin, Y.; Li, Y.; Hu, J.; Ju, Y. *Sens. Actuator, B* **2017**, *243*, 831.
- [37] Shen, P.; Hua, J. Y.; Jin, H. D.; Du, J. Y.; Liu, C. L.; Yang, W.; Gao, Q. Y.; Luo, H. J.; Liu, Y.; Yang, C. Y. *Sens. Actuator, B* **2017**, *247*, 587.
- [38] Rajasekhar, K.; Achar, C. J.; Govindaraju, T. *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 1584.
- [39] Chakraborty, G.; Ray, A. K.; Singh, P. K.; Pal, H. *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 8383.
- [40] Wu, Y. Y.; Yu, W. T.; Hou, T. C.; Liu, T. K.; Huang, C. L.; Chen, I. C.; Tan, K. T. *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 11507.
- [41] Dey, N.; Maji, B.; Bhattacharya, S. *Chem.-Asian J.* **2018**, *13*, 664.
- [42] Schluter, F.; Riehemann, K.; Kehr, N. S.; Quici, S.; Daniliuc, C. G.; Rizzo, F. *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 642.
- [43] Thomas, S. W.; Joly, G. D.; Swager, T. M. *J. Chem. Rev.* **2007**, *107*, 1339.
- [44] Anees, P.; Sreejith, S.; Ajayaghosh, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 13233.
- [45] Fan, X. P.; He, Q. Y.; Sun, S. G.; Li, H. J.; Pei, Y. X.; Xu, Y. Q. *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 1178.
- [46] Yu, Y.; Huang, Y. Y.; Hu, F.; Jin, Y. L.; Zhang, G. X.; Zhang, D. Q.; Zhao, R. *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 6374.
- [47] Gao, T.; Yang, S. Q.; Cao, X. Z.; Dong, J.; Zhao, N.; Ge, P.; Zeng, W. B.; Cheng, Z. *Anal. Chem.* **2017**, *89*, 10085.
- [48] Fan, J. M.; Zheng, D. M.; Huang, X. Y.; Ding, L. P.; Xin, Y. H.; Fang, Y. *Sens. Actuator, B* **2018**, *263*, 336.
- [49] Samanta, S.; Halder, S.; Das, G. *Anal. Chem.* **2018**, *90*, 7561.
- [50] Singh, P.; Mittal, L. S.; Kaur, S.; Kaur, S.; Bhargava, G.; Kumar, S. *Sens. Actuator, B* **2018**, *255*, 478.
- [51] Liyasova, M. S.; Schopfer, L. M.; Oksana, L. J. B. P. **2010**, *79*, 784.
- [52] Sun, Q.; Wang, W. S.; Chen, Z. Y.; Yao, Y. H.; Zhang, W. B.; Duan, L. P.; Qian, J. H. *Chem. Commun.* **2017**, *53*, 6432.
- [53] Jin, Q.; Feng, L.; Zhang, S. J.; Wang, D. D.; Wang, F. J.; Zhang, Y.; Cui, J. N.; Guo, W. Z.; Ge, G. B.; Yang, L. *Anal. Chem.* **2017**, *89*, 9884.
- [54] Ge, G. B.; Feng, L.; Jin, Q.; Wang, Y. R.; Liu, Z. M.; Zhu, X. Y.; Wang, P.; Hou, J.; Cui, J. N.; Yang, L. *Anal. Chim. Acta* **2017**, *989*, 71.

(Lu, Y.)