

新型单态氧荧光探针的应用研究*

林黎升

(福建师范大学 光电与信息工程学院,福建 福州 350007)

【摘要】单态氧是一种重要的高活性氧自由基,在材料科学,生物以及医学等领域具有重要的研究价值。本文阐述了近年新兴的商品化单态氧荧光探针(Singlet Oxygen Sensor Green reagent, SOSG)的光谱特性和检测原理,并综述了其在单态氧检测应用情况。最后,展望了SOSG在单态氧检测应用研究的发展趋势。

【关键词】单态氧; 荧光探针; 光谱特性; 荧光成像

【中图分类号】Q2-3 **【文献标识码】**A **【文章编号】**1673-1891(2012)03-0033-03

引言

单态氧(1O_2)是一种处于最低激发态的分子氧,与超氧阴离子自由基、羟基自由基以及过氧化氢等活性氧相似,具有高氧化性。 1O_2 在生物、医学、化学等领域发挥着重要作用,特别是光动力学疗法治疗肿瘤以及老年性黄斑病变等疾病具有重要作用,是II型光动力反应机制中实现细胞杀伤的主要的毒性物质^[1]。

目前, 1O_2 的测量方法主要有直接检测法和间接检测法。直接检测法,是利用近红外光电探测器件直接检测 1O_2 在1270 nm附近的辐射发光。由于 1O_2 发光极为微弱,Ogilby等人估算在水溶液中 2.6×10^6 个 1O_2 分子才能辐射出一个光子^[2],而且 1O_2 在生物环境中的寿命非常短(0.17~5 μ s)^[2-4]。此外,用于检测 1O_2 的光电倍增管的光阴极面小,量子效率较低,因此开发 1O_2 的直接检测系统需要面临许多技术难题。间接检测法主要是利用各种探针对 1O_2 具有特异的选择性结合,通过测量探针或者探针与 1O_2 结合后的衍生物的吸光度,化学发光,荧光变化等实现间接测量 1O_2 。间接检测法不仅能够有效地避开直接检测 1O_2 的1270 nm发光所面临的巨大的技术难题,而且其检测的灵敏度高,且探测范围多在可见光波段,探测器量子效率高,便于检测。因此,间接检测法广泛应用于 1O_2 相关研究。荧光探针法是目前一种主要的间接检测 1O_2 方法。目前单态氧荧光探针主要有9-[2-(3-carboxy-9,10-diphenyl anthryl)-6-hydroxy-3H-xanthen-3-one]衍生物(DPAXs),9-[2-(3-carboxy-9,10-dimethyl anthryl)-6-hydroxy-3H-xanthen-3-one] (DMAX)以及新型单态氧荧光探针(Singlet Oxygen Sensor Green reagent, SOSG)等^[5-7]。

1 SOSG光谱特性及检测原理

收稿日期:2012-07-20

*基金项目:福建省教育厅B类项目(项目编号:JB10022)。

作者简介:林黎升(1980-),男,福建惠安人,助理研究员,主要研究方向为生物医学光谱学。

1.1 SOSG的光谱特性

新型单态氧荧光探针(Singlet Oxygen Sensor Green reagent, SOSG)。SOSG是由Invitrogen公司研制并已商业化的一种新型 1O_2 荧光探针。该探针对 1O_2 具有高选择性,而不与其它诸如羟基,超氧阴离子等活性氧反应,具有 1O_2 检测灵敏度高,选择性好等优点,已经成为 1O_2 检测的主要荧光探针之一^[8-10]。

SOSG荧光光谱测量采用英国Edinburgh Instruments公司研制的FLS920稳态和瞬态荧光光谱探测系统。将SOSG溶解在甲醇中,终浓度为2 μ M,放置在10 \times 10 mm的石英比色皿中。激发波长250~550 nm,扫描步长为20 nm,检测发射波长从300~650 nm,扫描步长为5 nm。各种色标表示不同的荧光强度。SOSG的荧光激发-发射矩阵如图1所示。由图可知,甲醇溶液中的SOSG在最佳激发波长375 nm激发下会发射出405和425 nm两个相邻荧光峰。另外,当激发波长大于420 nm, SOSG样品出现了SOSG-EP特有的525 nm荧光,但强度比较微弱。Nonell等人认为SOSG样品在紫外或是可见光的连续激发后,发生了光敏反应,自身产生了少量的 1O_2 ,形成了SOSG-EP^[10]。

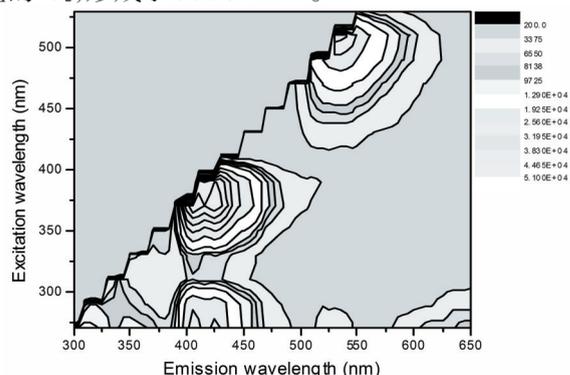


图1 SOSG荧光激发-发射矩阵图

1.2 SOSG的单态氧检测原理

SOSG是一种水溶性 $^1\text{O}_2$ 荧光探针,SOSG一旦与 $^1\text{O}_2$ 发生化学反应后,生成一种具有显著荧光特征的内氧化物 SOSG endoperoxides (SOSG-EP),其与 $^1\text{O}_2$ 的反应原理如图2所示^[10]。SOSG-EP在504 nm波长激发下,会产生显著的525 nm绿色荧光,通过检测 SOSG-EP在525 nm的荧光强度就可以实现对 $^1\text{O}_2$ 的间接检测。

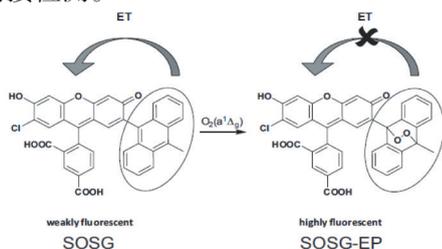


图2 SOSG与的 $^1\text{O}_2$ 反应机理图

2 SOSG在单态氧检测中的应用

2.1 荧光光谱法测量单态氧

利用 SOSG-EP 荧光光谱测量 $^1\text{O}_2$ 主要是利用 SOSG 与 $^1\text{O}_2$ 反应后生产 SOSG-EP,其在504nm光激发下会产生显著的525 nm的绿色荧光,通过测量体系反应后的荧光光谱实现对 $^1\text{O}_2$ 的间接检测。Rogers等人利用 SOSG 通过测量525 nm处荧光变化,发现聚合物凝胶结合血卟啉光敏剂的支架在光照条件下会产生有效的光毒性物质 $^1\text{O}_2$ ^[6]。Zhang等人利用 SOSG 发现 Rose Bengal 经过银表面等离子体增强后, $^1\text{O}_2$ 的产额显著增强,是未经过银金属增强的3倍^[11]。结果与最近巴西的 Luciana 等人利用 SOSG 测量了核黄素溶液在银胶作用后 $^1\text{O}_2$ 的金属增强效应显著结果相一致^[12]。2008年,Zhao等人利用 SOSG 验证了不同水溶性富勒烯 C60 在人体角质细胞中 $^1\text{O}_2$ 产量及其细胞毒性研究。SOSG 实验结果表明无论是单节性还是聚集状态的 C60 均能产生 $^1\text{O}_2$,

但是聚集状态下的 C60 光化学反应产生 $^1\text{O}_2$ 能力较弱^[13]。2009年,西班牙的 Nonell 等人首次研究了 SOSG 的光敏特性,研究结果表明,SOSG 自身在紫外或是可见光辐照下会产生光敏反应,生产 $^1\text{O}_2$,这一结论对利用 SOSG 定量测量 $^1\text{O}_2$ 的相关研究提出了新问题^[14]。去年,丹麦的 Ogilby 研究小组深入研究了 SOSG 在牛血清蛋白环境下以及细胞中的光化学特性。结果表明 SOSG 自身不仅在光敏反应后能产生 $^1\text{O}_2$,而且与 $^1\text{O}_2$ 反应后的内氧化物 SOSG-EP 也是有效的 $^1\text{O}_2$ 光敏剂,特别指出,其在定量测量体系 $^1\text{O}_2$ 产量时,可能导致结果错误^[10]。因此,其建议在利用 SOSG 定量测量 $^1\text{O}_2$ 时,激发光源的选择要避开 SOSG 的吸收带,已达到最大限度的降低其自身的光敏反应对实验结果的影响。最近,抗菌光动力学疗法的日益兴起,美国哈佛医学院的 Hamblin 小组深入研究了革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌的光动力学机制,他们利用 SOSG 和 3'-(p-hydroxyphenyl) fluorescein (HPF) 两种不同的活性氧探针,指出革兰氏阴性菌更易受羟自由基的影响,而革兰氏阳性菌则更易受 $^1\text{O}_2$ 影响^[15]。

2.2 显微荧光成像研究单态氧

荧光成像分析则是利用525 nm的绿色荧光信息实现对 $^1\text{O}_2$ 的显微成像。荧光成像分析 $^1\text{O}_2$ 不仅可以获得 $^1\text{O}_2$ 生成的总量信息,还可以获得 $^1\text{O}_2$ 在细胞以及组织中的空间分布信息。表1综述了目前在 $^1\text{O}_2$ 荧光成像研究是主要结果。相当一部分的工作利用 SOSG 研究植物的光应激后光系统II产生的 $^1\text{O}_2$ 成像检测^[6,9,16]。此外,特别值得一提的是国内的李步洪小组巧妙地利用 SOSG 不易渗透进入细胞膜的特性,研究 $^1\text{O}_2$ 的细胞环境下的有效扩散距离。研究结果表明,在活细胞环境下 $^1\text{O}_2$ 最大扩散距离不大于85 nm^[17]。

表1 SOSG在 $^1\text{O}_2$ 活体成像研究

完成人	研究内容	实验结果
Yamada H. et al ^[18]	比较研究了新型蝶啶衍生物和蝶啶的光动力学反应细胞毒性研究	研究表明,新型蝶啶衍生物在胰腺癌 PANC-1 细胞株孵育后,经 UV-A 照射后能够有效地产生光敏毒性物质 $^1\text{O}_2$,显微镜下,光敏产物 $^1\text{O}_2$ 随新型蝶啶的孵育时间和孵育浓度增加,SOSG 绿色荧光图像逐渐增加
Flors C. et al ^[6]	利用 SOSG 研究拟南芥在经过光氧化应激后 $^1\text{O}_2$ 的生成情况	显微镜下拟南芥在 DCMU 抑制剂的作用下 $^1\text{O}_2$ 产量显著增强,另外,随着光照时间的推移, $^1\text{O}_2$ 产量也不断增加
Hideg E. ^[9]	比较研究了 DanePy, DanePy 草酸盐,SOSG 和 MVP 四种荧光探针在烟草叶子的毒性,亚细胞定位,以及对光抑制所产生的 $^1\text{O}_2$ 的捕获能力。	结果发现 SOSG 能够灵敏地捕获 $^1\text{O}_2$,且经特殊处理后能渗透进入上皮细胞并优先定位于细胞核,另外,充分肯定了其在植物光合作用的应用前景
沈毅等人 ^[17]	利用 SOSG 研究了细胞内单态氧的扩散距离	研究表明,定位于细胞膜内的 PpIX 光敏反应产生的 $^1\text{O}_2$ 能够扩散逃逸出细胞膜与 SOSG 发生,产生显著绿色荧光,而定位于细胞核的 TMPyP 光敏剂产生的 $^1\text{O}_2$ 无法逃逸出细胞外。结果再次证明了细胞环境下 $^1\text{O}_2$ 的扩散距离十分有限
Sinha R.K. et al ^[9]	研究 SCPs 蛋白在光系统 II (PS II) 中光诱导产生 $^1\text{O}_2$ 的影响	通过 SOSG 荧光成像结果表明,SCPs 蛋白能够有效地阻止在光系统 II 受损情况下 $^1\text{O}_2$ 的产生

3 展望

$^1\text{O}_2$ 是一种重要的活性氧分子,具有很高的生物活性, $^1\text{O}_2$ 相关研究对人们进一步揭示出生物细胞氧化衰老、诱发癌变等一些重大问题的机理,从而寻求抗衰老和癌症治疗等方面的有效途径和方法,特别是它的活体测定,对于解释生命机体的各种生理、病状等有着重要的意义。

由于 $^1\text{O}_2$ 自身的荧光寿命十分短暂,通过直接检测 1270 nm 附近的近红外发光,特别是实现对活细胞、组织体中的 $^1\text{O}_2$ 进行实时检测仍然是一项极具挑

战的任务。SOSG 荧光探针间接测量 $^1\text{O}_2$,具有测量灵敏度高, $^1\text{O}_2$ 选择性好等优点,广受研究工作者的青睐。然而,SOSG 自身同样也存在一些不足,例如,SOSG 自身在紫外光照射下会产生 $^1\text{O}_2$,另外,自身无法自由地渗透进入细胞中,这些使其在 $^1\text{O}_2$ 的定量测量研究和 $^1\text{O}_2$ 的亚细胞研究方面存在一定的局限性。尽管如此,SOSG 在定性检测 $^1\text{O}_2$,仍具有自身显著的优势。随着其化学结构的进一步修饰和优化,及实验方案的不断改进和优化,SOSG 在 $^1\text{O}_2$ 检测的许多应用领域,仍具有明显的优势,应用前景十分广阔。

注释及参考文献:

- [1]WEISHAUP T K R, GOMER C J, DOUGHERTY T J. Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photoinactivation of a murine tumor[J]. *Cancer Research*, 1976, 36(7 PT 1): 2326–2329.
- [2]PATTERSON M S, MADSEN S J, WILSON B C. Experimental tests of the feasibility of singlet oxygen luminescence monitoring in vivo during photodynamic therapy[J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 1990, 5(1): 69–84.
- [3]NIEDRE M, PATTERSON M S, WILSON B C. Direct near-infrared luminescence detection of singlet oxygen generated by photodynamic therapy in cells in vitro and tissues in vivo[J]. *Photochemistry and Photobiology*, 2002, 75(4): 382–391.
- [4]NAGANO T. Bioimaging probes for reactive oxygen species and reactive nitrogen species[J]. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 2009, 45(2): 111–124.
- [5]TANAKA K, MIURA T, UMEZAWA N, et al. Rational design of fluorescein-based fluorescence probes. Mechanism-based design of a maximum fluorescence probe for singlet oxygen[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2001, 123(11): 2530–2536.
- [6]FLORS C, FRYER M J, WARING J, et al. Imaging the production of singlet oxygen in vivo using a new fluorescent sensor, Singlet Oxygen Sensor Green[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2006, 57(8): 1725–1734.
- [7]RAGAS X, JIMENEZ-BANZO A, SANCHEZ-GARCIA D, et al. Singlet oxygen photosensitisation by the fluorescent probe Singlet Oxygen Sensor Green[J]. *Chemical Communications*, 2009, (20): 2920–2922.
- [8]ROGERS C J, DICKERSON T J, WENTWORTH P, et al. A high-swelling reagent scaffold suitable for use in aqueous and organic solvents[J]. *Tetrahedron*, 2005, 61(51): 12140–12144.
- [9]HIDEG E. A comparative study of fluorescent singlet oxygen probes in plant leaves[J]. *Central European Journal of Biology*, 2008, 3(3): 273–284.
- [10]GOLLMER A, ARNBJERG J, BLAIKIE F H, et al. Singlet Oxygen Sensor Green(R): Photochemical Behavior in Solution and in a Mammalian Cell[J]. *Photochemistry and Photobiology*, 2011, 87(3): 671–679.
- [11]ZHANG Y, ASLAN K, PREVITE M J, et al. Metal-enhanced singlet oxygen generation: a consequence of plasmon enhanced triplet yields[J]. *Journal of Fluorescence*, 2007, 17(4): 345–349.
- [12]de Melo LS, Gomes AS, Saska S, et al. Singlet Oxygen Generation Enhanced by Silver-Pectin Nanoparticles[J]. *Journal of Fluorescence*, 2012, DOI 10.1007/s10895-012-1107-4.
- [13]ZHAO B, BILSKI P J, HE Y Y, et al. Photo-induced reactive oxygen species generation by different water-soluble fullerenes(C) and their cytotoxicity in human keratinocytes[J]. *Photochemistry and Photobiology*, 2008, 84(5): 1215–1223.
- [14]RAGAS X, JIMENEZ-BANZO A, SANCHEZ-GARCIA D, et al. Singlet oxygen photosensitisation by the fluorescent probe Singlet Oxygen Sensor Green(R)[J]. *Chemical Communications*, 2009, (20): 2920–2922.
- [15]Huang L, Xuan Y, Koide Y, et al. Type I and Type II mechanisms of antimicrobial photodynamic therapy: An in vitro study on gram-negative and gram-positive bacteria[J]. *Lasers in Surgery and Medicine*, 2012, 44: 490–499.
- [16]DRIEVER S M, FRYER M J, MULLINEAUX P M, et al. Imaging of reactive oxygen species in vivo[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2009, 479: 109–116.
- [17]SHEN Y, LIN H Y, HUANG Z F, et al. Indirect imaging of singlet oxygen generation from a single cell[J]. *Laser Physics Letters*, 2011, 8(3): 232–238.
- [18]YAMADA H, ARAI T, ENDO N, et al. Photodynamic effects of a novel pterin derivative on a pancreatic (下转 38 页)

连分数有密切联系,也蕴含着循环与不循环,“整体”与部分的辩证关系。

4 无限梯形电路与无理数的联系

当电路中串联和并联的电阻取不同值时,电路的等效电阻值可能是其它无理数如 $\sqrt{2}$ 、 $\sqrt{3}$ 等的某种表示。而 $\sqrt{2}$ 、 π 、 e 这三个无理数又可以统一在一

个解析表达式中^[2],也就是说, $\sqrt{2}$ 、 π 、 e 这三个无理数是有密切关系的,因此,无限梯形电路与 $\sqrt{2}$ 、 π 、 e 、 $\sqrt{3}$ 、 $\sqrt{5}$ 等众多无理数有密切联系。

数源于客观现实,现实世界是数学的无限原型,一个如此简单的电路的等效电阻竟与无理数有着如此广泛的联系,这值得我们深思和进一步研究。

注释及参考文献:

- [1]郭木森.电工学[M]第二版.北京:高等教育出版社,1987.10:50.
- [2]周建勋,徐沥泉.数律条条美绝伦[J].数学通报,2003(7):39-43.

A Circuit Closely Related to the Golden Section

FANG Zhi-cong

(Xichang College, Xichang, Sichuan 615013)

Abstract: The infinite ladder circuit form and its equivalent resistance expression are concise and graceful; its equivalent resistance, voltage and current assignment are closely connected with the golden section, which reflects the charming of number and the beauty of reality.

Key words: The golden section; Infinite; Ladder; Circuit

(上接35页)

cancer cell line[J].Biochemical and Biophysical Research Communications, 2005, 333(3):763-767.

- [19]SINHA R K, KOMENDA J, KNOPPOVA J, et al.Small CAB-like proteins prevent formation of singlet oxygen in the damaged photosystem II complex of the cyanobacterium Synechocystis sp PCC 6803[J].Plant Cell and Environment, 2012, 35(4):806-818.

Application in Detection of Singlet Oxygen by a Novel Fluorescent Probe

LIN Li-sheng

(College of Photonic and Electronic Engineering, Fujian Normal University, Fuzhou, Fujian 350007)

Abstract: Singlet oxygen is an important kind of reactive oxygen species. It is important in fields that range from materials science to biology and medicine. In this paper, the spectral characteristics and principles of detection of singlet oxygen for a novel fluorescent probe (Singlet Oxygen Sensor Green reagent, SOSG) were summarized, and the state in application for detection of singlet oxygen was also reviewed. Finally, the developing tendency of the SOSG was analyzed briefly.

Key words: Singlet oxygen; Fluorescent probe; Spectral characteristic; Fluorescence imaging