囊泡型荧光纳米界面的构建及其对CD44蛋白的比例型传感

薛佳男, 雷海瑞, Somnath Mukherjee, 杨丹, 严军林, 刘静*, 房喻

应用表面与胶体化学教育部重点实验室; 陕西师范大学化学化工学院, 西安 710119

*通讯作者, E-mail: jliu@snnu.edu.cn

收稿日期: 2019-07-12; 接受日期: 2019-09-24; 网络版发表日期: 2019-11-05

国家自然科学基金(编号: 21573141, 21273143)、中央高校基金项目(编号: GK201701004)和高等学校学科创新引智计划(编号: B14041)资助项目

摘要 本文设计合成了两亲性Eu(III)配合物(EuL^{3+})、两亲性香豆素衍生物(CA)以及荧光素修饰的透明质酸(HA-FA). EuL^{3+} 和CA可在水中共组装形成带正电荷的囊泡型荧光纳米界面($\text{EuL}^{3+}/\text{CA}$). HA-FA可通过静电引力络合在 $\text{EuL}^{3+}/\text{CA}$ 表面, 促使CA与FA之间发生有效的荧光共振能量转移, 体系的荧光发射以荧光素的绿色荧光为主. 当肿瘤细胞标识物CD44蛋白与络合在囊泡表面上的透明质酸发生特异相互作用后, 降低了CA与FA之间的能量转移效率, 体系的荧光发射从绿色转变为蓝色. 据此, 实现了对CD44的高灵敏检测($\text{DL}=1.79\times 10^{-7} \text{ g/mL}$), 而所测试的氨基酸、蛋白质等生物分子几乎不对荧光纳米界面的荧光性质产生影响. 基于此, 我们成功地将 $\text{EuL}^{3+}/\text{CA}/\text{HA-FA}$ 用于人乳腺癌细胞MCF-7和MDA-MB-231悬浮液中CD44蛋白的高效检测, 该工作为构建新型CD44蛋白荧光探针提供了思路, 为癌症早期诊断和治疗奠定了基础.

关键词 自组装, 囊泡, 荧光, 比例型传感, CD44蛋白

1 引言

癌症已成为威胁人类生命健康的重大疾病之一, 做好癌症的早期诊断对治疗该类疾病至关重要^[1,2]. CD44蛋白通常在恶性肿瘤细胞表面有着过度表达, 被认为是癌细胞中最常见的标识物之一^[3~5]. 因此, 癌细胞中CD44蛋白的精准检测对于癌症早期诊断及治疗尤为重要. 迄今为止, 已经报道的CD44蛋白检测方法有: 逆转录-聚合酶链反应^[6]、Western印迹^[7]、酶联免疫吸附测定(enzyme linked immunosorbent assay, ELI-

SA)^[8]和基于透明质酸(hyaluronic acid, HA)的荧光化学传感器^[9]等. 其中, 由于基于HA的荧光化学传感方法避免了逆转录-聚合酶链反应和Western印迹中存在的耗时、昂贵和程序复杂等缺点而备受青睐. 将荧光小分子化合物^[10]、量子点^[11]或水溶性共轭聚合物^[9]等与HA结合, 实现了对CD44蛋白的高选择性、高灵敏度传感识别. 但业已报道的CD44荧光传感方法仅能实现对缓冲溶液中CD44蛋白的高灵敏检测, 而对癌细胞中CD44蛋白的检测方法仅限于荧光成像^[9~11], 显然, 成像方法很难实现对癌细胞中CD44蛋白的高灵敏精

引用格式: Xue J, Lei H, Somnath M, Yang D, Yan J, Liu J, Fang Y. Fluorescent vesicular nanointerface: construction and ratiometric sensing behavior toward CD44 protein. *Sci Sin Chim*, 2020, 50: 126–134, doi: [10.1360/SSC-2019-0086](https://doi.org/10.1360/SSC-2019-0086)

确检测. 因此, 实现对癌细胞悬浮液中CD44蛋白的精准检测不仅是一项巨大的挑战, 而且对于癌症的早期诊断和治疗具有重要意义.

基于超分子策略构建的荧光传感体系, 因其自身的组成动态特征和自适应特性使其对微环境变化极其敏感, 故表现出了超高的传感灵敏度^[12~15]. 因此, 利用自组装策略构建具有优异传感性能的传感体系已成为近年来传感领域特别是生物传感领域的研究热点之一. 本课题组^[16,17]利用两亲性Tb(III)配合物在水中的自组装过程构建了具有不同微观结构的超分子荧光纳米界面, 成功实现了对结构极为相似的核苷酸分子的精准区分, 并实现了对单链DNA构象折叠过程的监测.

鉴于CD44蛋白检测在癌症早期诊断和治疗中的重要性以及超分子聚集结构在传感中的突出优势, 我们利用两亲性Eu(III)配合物(EuL^{3+})与两亲性香豆素衍生物(CA)在水中共组装形成囊泡型荧光纳米界面($\text{EuL}^{3+}/\text{CA}$, 图1). 荧光素(fluorescein, FA)标记的透明质酸(HA-FA)可通过静电相互作用络合在 $\text{EuL}^{3+}/\text{CA}$ 表面, 促使能量给体CA和能量受体FA之间的距离足够小, 二者之间发生荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)导致体系的荧光发射由CA的蓝色荧光转变为FA的绿色荧光, 向体系中加入CD44蛋白后, CD44蛋白与透明质酸之间的特异相互作用导致CA-FA之间距离增大, 进而降低了二者之间的荧光共振能量转移效率, 故体系的荧光发射由绿色转变为蓝色, 据此实现了对CD44蛋白的高选择性、高灵敏度、比例型传感. 相比于单一信号传感, 比例型传感可提供更多的输出信号, 可实现对待分析物更精准的检测^[18~20]. 该传感体系不仅实现了缓冲溶液中CD44蛋白的高效检测, 而且还实现了细胞悬浮液中CD44蛋白的高灵敏、高选择性识别. 据我们所知, 该

图1 荧光纳米界面 $\text{EuL}^{3+}/\text{CA}/\text{HA-FA}$ 对CD44蛋白的传感示意图(网络版彩图)

Figure 1 Schematic illustration of the dual-emission sensing of CD44 with the chemosensors (color online).

传感体系为首例直接在癌细胞悬浮液中检测CD44蛋白的研究工作, 有助于人体血液中癌症细胞的早期诊断.

2 实验部分

2.1 试剂与仪器

试剂: 透明质酸钠($M < 10$ kDa)购买于华熙福瑞达生物医药有限公司(中国); 人体CD44蛋白购买于北京百普赛斯生物科技有限公司(中国); 7-羟基-3-羧基香豆素、5-羟基荧光素均购自上海笛柏化学品技术有限公司(中国); N -羟基琥珀酰亚胺(NHS)、十六胺、 $\text{EuCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 均购买于梯希爱(上海)化成工业发展有限公司; 甲醇、乙醚、二氯甲烷、乙酸乙酯、四氢呋喃等溶剂均为国药集团化学试剂有限公司产品(中国), 纯度至少为分析纯, 所有溶剂使用前均按照标准方法进行纯化; 实验用水均为高纯水.

仪器: 超导傅里叶数字化核磁共振谱仪(600 MHz, AVANCEF, Bruker, 德国); 傅里叶变换红外光谱仪(KBr压片, EQUINX55, Bruker); 液质联用(LC-MS, Bruker); 动态光散射仪(Nano-ZS90, Malvern, 英国); 紫外可见分光光度计(U-3900, Hitachi, 日本); FLS 980单光子计数时间分辨荧光光谱仪(Edinburgh Instruments Ltd, 英国); 透射电子显微镜(JEM-2100, JEOL, 日本), 样品未经染色处理即用于透射电子显微镜(TEM)观察.

2.2 化合物CA的合成

将7-羟基-3-羧基香豆素(103 mg, 0.5 mmol), N -羟基琥珀酰亚胺(86.3 mg, 0.75 mmol)溶于 N,N -二甲基甲酰胺(DMF) (10 mL)中, N_2 保护下冰浴搅拌0.5 h, 在上述混合液中加入EDC·HCl (143.8 mg, 0.75 mmol), 冰浴条件下继续搅拌0.5 h后, 加入十六胺(121 mg, 0.5 mmol), 室温反应24 h. 反应结束后, 将反应液逐滴滴入水中, 有沉淀析出, 抽滤所得滤饼用甲醇进行多次洗涤, 真空干燥后得到黄褐色固体(140 mg, 产率为65%, 合成路线如图2所示). 熔点(m.p.): 154.9~155.6°C; 红外光谱(IR) (KBr, ν_{max} (cm^{-1})): 3335 (O-H), 2925, 2853 (C-H), 1717 (O=C-O), 1628 (C=C), 1470, 1380 (C-H), 1334 (C-N), 1229 (C-O); $^1\text{H-NMR}$ δ_{H} (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, Me_4Si): 11.05 (1H, OH), 8.77 (1H, CONH), 8.63 (1H, CCHC), 7.80 (1H, C_6H_6), 6.88

图2 CA, EuL^{3+} 和HA-FA的合成路线Figure 2 Synthesis of CA, EuL^{3+} and HA-FA.

(1H, C_6H_6), 6.79 (1H, C_6H_6), 3.32 (2H, NHCH_2), 1.48 (2H, CH_2CH_2), 1.22 (26H, CH_2CH_2), 0.84 (3H, CH_3); ^{13}C -NMR δ_{C} (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, Me_4Si): 163.58 (2C, $\text{C}=\text{O}$), 161.36 (1C, CHCCH), 156.21 (1C, CHCC), 147.87 (1C, CCHC), 131.93 (1C, CCHCH), 114.29 (1C, COCCH), 113.75 (1C, CCHCH), 111.09 (1C, CCCH), 101.71 (1C, CCHC), 39.65 (12C, CH_2), 31.26 (1C, CH_2), 26.34 (1C, CH_2), 22.05 (1C, CH_2CH_3), 13.90 (1C, CH_3); MS (m/z , ESI^-): 理论值: $\text{C}_{26}\text{H}_{39}\text{NO}_4$, 428.2801 ($[\text{M}+\text{H}]^-$), 实测值: 428.2826.

2.3 EuL^{3+} 的合成

将Ligand^[16] (195.8 mg, 0.3 mmol)溶于30 mL水中并在常温下搅拌. 将 $\text{EuCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (77.5 mg, 0.30 mmol)溶于40 mL水中并将其逐滴滴加到上述溶液中, 常温条件下反应24 h. 反应结束后, 减压蒸除溶剂, 将所得固体溶于20 mL甲醇中, 并逐滴滴加到20 mL乙醚中, 有白色沉淀析出, 抽滤得到白色固体, 重复以上过程3次. 所得白色固体用二氯甲烷(20 mL)重结晶两次, 真

空干燥后得到白色固体(204.8 mg, 产率为75%, 合成路线如图2所示). IR (KBr, ν_{max} (cm^{-1})): 3349 (N-H), 2933, 2856 (C-H), 1666 ($\text{C}=\text{O}$), 1469, 1373 (C-N); MS (m/z , ESI^+): 理论值: $\text{C}_{34}\text{H}_{68}\text{Cl}_3\text{N}_8\text{O}_4\text{Eu}$: 268.4859 ($[\text{M}+3\text{Cl}]^{3+}$), 420.2135 ($[\text{M}+2\text{Cl}]^{2+}$), 875.3964 ($[\text{M}+\text{Cl}]^+$), 实测值: 268.4860, 420.2129, 875.3936.

2.4 HA-FA的合成

将透明质酸钠(520 mg, 0.06 mmol)溶于30 mL超纯水中, 室温搅拌使其完全溶解后, 向上述溶液中加入15 mL乙醇稀释. 在上述溶液中依次加入N-羟基琥珀酰亚胺(552 mg, 4.80 mmol)和EDC·HCl(920 mg, 4.80 mmol), 室温搅拌3 h. 将5-氨基荧光素(417 mg, 1.2 mmol)溶于15 mL乙醇中并将其逐滴加入到上述溶液中, 室温条件下反应72 h. 反应结束后, 所得反应液用去离子水透析直至透析的水为无色, 透析纯化后HA-FA溶液经冷冻干燥得到橙色固体(397.5 mg, 产率为75%). 利用FTIR和 ^1H NMR表征HA-FA的化学结构(图S1, 网络版补充材料): IR (KBr, ν_{max} (cm^{-1})): 3845

(O-H), 1745(C=O), 1661(N-C=O), 1417(C-N), 1084, 1051(C-O-C), 其中1745 cm^{-1} 处的振动信号为FA结构中C=O的伸缩振动信号峰(图S1(a)); 此外, 化合物HA-FA的 ^1H NMR谱中6.77~7.85 ppm范围内出现了FA芳香环上氢质子的信号峰, 信号峰宽化并向低场移动(图S1(b)), 表明FA已成功修饰在HA链上, 通过报道的标准方法^[10]测定了HA-FA中FA的标记度为0.68% (图S2).

2.5 EuL^{3+} /CA组装体制备

取 EuL^{3+} (100 $\mu\text{mol/L}$)、CA (6 $\mu\text{mol/L}$)溶液加入Tris-HCl (10 mM, pH=8.0)缓冲溶液中, 50 $^{\circ}\text{C}$ 恒温加热2 h后自然冷却至室温储存, 得到 EuL^{3+} /CA在水中的组装体.

3 结果与讨论

3.1 基本光物理性质研究

构建基于FRET的超分子荧光传感体系应满足FRET过程的基本要求. 首先, 能量给体的发射光谱和能量受体的吸收光谱应具有一定程度的重叠. 其次, 给体和受体之间的距离应足够小(<10 nm). 基于以上考虑, 我们研究了CA (能量给体)和HA-FA (能量受体)的基本光物理性质(图3). CA的摩尔吸光系数为 $3.07 \times 10^3 \text{ L}/(\text{mol cm})$ (图S3), 荧光传感界面的荧光量子产率为0.35. 如图3所示, HA-FA的吸收光谱(λ_{abs} :

455 nm)与CA的发射光谱(λ_{em} : 448 nm)的重叠面积为HA-FA的吸收光谱面积的60%, 表明如果CA与HA-FA之间的距离足够小, 二者间即可发生有效的FRET过程.

3.2 基于FRET的囊泡型荧光纳米界面构建

综上所述, 能量给体和受体之间的距离是构建FRET体系的关键因素之一, 为了使CA和HA-FA间的距离足够小以确保FRET过程发生, 本工作利用带正电荷的两亲性配合物 EuL^{3+} 与两亲性香豆素衍生物CA共组装, 构建了囊泡型荧光纳米界面 EuL^{3+} /CA^[16]. 由于 EuL^{3+} /CA表面带正电荷, 带负电荷的HA-FA可通过静电相互作用络合到 EuL^{3+} /CA表面, 确保CA和FA间的距离足够小.

为了构建高效的传感体系, 对CA、HA-FA和 EuL^{3+} 的浓度进行了优化. 首先, 对能量给体CA的浓度进行了筛选(图S4). 实验结果表明, 当 EuL^{3+} 浓度为100 $\mu\text{mol/L}$, CA浓度为6 $\mu\text{mol/L}$ 时, EuL^{3+} /CA溶液的荧光强度最强, 当CA浓度增大时(8和10 $\mu\text{mol/L}$), EuL^{3+} /CA溶液的荧光被部分淬灭, 这是由于高浓度下CA发生了聚集诱导荧光淬灭现象. 因此, 以6 $\mu\text{mol/L}$ 作为CA的最佳浓度. 其次, 利用动态光散射(dynamic light scattering, DLS)技术测定了 EuL^{3+} /CA溶液的临界聚集浓度(critical aggregation concentration, CAC)^[21]. 分别配制 EuL^{3+} 浓度为10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90和100 $\mu\text{mol/L}$ 的 EuL^{3+} /CA

图 3 (a) CA (蓝色)和HA-FA (绿色)的紫外-可见吸收光谱(虚线)和荧光发射光谱(实线); (b) EuL^{3+} /CA (黑色), EuL^{3+} /HA-FA (红色)和 EuL^{3+} /CA/HA-FA (蓝色)的荧光发射光谱. EuL^{3+} , CA, HA-FA和Tris-HCl缓冲液(pH=8.0)的浓度分别为100 $\mu\text{mol/L}$, 6 $\mu\text{mol/L}$, 4.5 mg/L和10 mmol/L. 插图为365 nm紫外灯照射下溶液的照片: EuL^{3+} /CA (1), EuL^{3+} /HA-FA (2)和 EuL^{3+} /CA/HA-FA (3) (网络版彩图)

Figure 3 (a) Normalized UV-vis absorption spectra (dash line) and fluorescence emission spectra (solid line) of CA (blue) and HA-FA (green). (b) Fluorescence emission spectra of EuL^{3+} /CA, EuL^{3+} /HA-FA and EuL^{3+} /CA/HA-FA. The concentration of EuL^{3+} , CA and HA-FA was 100 $\mu\text{mol/L}$, 6 $\mu\text{mol/L}$ and 4.5 mg/L respectively in 10 mmol/L Tris-HCl buffer (pH=8.0). The inset shows the photograph of the samples under a 365 nm UV lamp (color online).

溶液($[\text{EuL}^{3+}]:[\text{CA}]=100:6$), 测定 $\text{EuL}^{3+}/\text{CA}$ 溶液光散射强度随浓度的变化, 确定了 $\text{EuL}^{3+}/\text{CA}$ 的CAC约为 $32/1.9 \mu\text{mol/L}$ (图4(a)). 同时, DLS测定结果表明, $\text{EuL}^{3+}/\text{CA}$ ($100 \mu\text{mol/L}/6 \mu\text{mol/L}$)组装体的平均粒径约为 130 nm (图4(b)). TEM和AFM观察结果也证实了 $\text{EuL}^{3+}/\text{CA}$ 组装形成了囊泡结构, 其直径范围为 $50\sim 500 \text{ nm}$, 与DLS测定结果基本一致(图4(c, d)).

此外, 对能量受体HA-FA的浓度也进行了优化. 向 $\text{EuL}^{3+}/\text{CA}$ ($100 \mu\text{mol/L} \text{ EuL}^{3+}/6 \mu\text{mol/L} \text{ CA}$)溶液中逐渐添加HA-FA时, $\text{EuL}^{3+}/\text{CA}$ 的荧光强度(I_{448})逐渐降低, 而HA-FA的荧光强度(I_{524})则逐渐增加(图S5), 当HA-FA的浓度增加至 4.5 mg/L 时, 其荧光强度达到最大值, 表明HA-FA已在 $\text{EuL}^{3+}/\text{CA}$ 表面达到吸附饱和, 以此作为HA-FA的最佳浓度. 若体系中含有CA或 $\text{EuL}^{3+}/\text{CA}$, 在相同的激发波长下几乎观察不到HA-FA的荧光(图S6), 表明 $\text{EuL}^{3+}/\text{CA}$ 和HA-FA之间发生了有效的FRET

过程. 此外, $\text{EuL}^{3+}/\text{CA}$ 的Zeta电位为 39.3 mV , 向溶液中加入HA-FA后, 其Zeta电位降至 27.6 mV , 表明带负电荷的HA-FA通过静电作用络合在了 $\text{EuL}^{3+}/\text{CA}$ 表面(图S7), 我们成功构建了基于 $\text{EuL}^{3+}/\text{CA}$ 和HA-FA的超分子荧光纳米界面. 此外, 我们测试了pH分别为 $6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5$ 的 $\text{EuL}^{3+}/\text{CA}$ 溶液和 $\text{EuL}^{3+}/\text{CA}/\text{HA-FA}$ 溶液的荧光发射光谱, 实验结果如图S8所示, 可以看出当溶液pH为 8.0 和 8.5 时, CA的发光效率较高且CA与FA之间的FRET效率较高, 故该荧光纳米界面的最佳pH范围为 $8.0\sim 8.5$. 我们还监测了 $\text{EuL}^{3+}/\text{CA}/\text{HA-FA}$ 荧光纳米界面的动力学稳定性, 结果如图S9所示, $\text{EuL}^{3+}/\text{CA}/\text{HA-FA}$ 的荧光发射光谱在 2 h 内基本不发生改变, 表明其具有很好的稳定性, 为后续CD44蛋白的比例型传感奠定了基础. 根据文献方法^[22-24]计算了该超分子纳米界面的FRET效率为 57% (表1, 计算过程参见补充材料).

图4 (a) 光散射强度与 $\text{EuL}^{3+}/\text{CA}$ 浓度的线性关系图; (b) $\text{EuL}^{3+}/\text{CA}$ 组装体的粒径分布; (c) $\text{EuL}^{3+}/\text{CA}$ 聚集体的TEM图; (d) $\text{EuL}^{3+}/\text{CA}$ 聚集体的AFM图($100 \mu\text{mol/L} \text{ EuL}^{3+}/6 \mu\text{mol/L} \text{ CA}$) (网络版彩图)

Figure 4 (a) Plot of the count rate against the concentration of $\text{EuL}^{3+}/\text{CA}$ system. (b) Particle size distribution of $\text{EuL}^{3+}/\text{CA}$ aggregations. (c) TEM image of $\text{EuL}^{3+}/\text{CA}$ aggregations. (d) AFM image of $\text{EuL}^{3+}/\text{CA}$ aggregations ($100 \mu\text{mol/L} \text{ EuL}^{3+}/6 \mu\text{mol/L} \text{ CA}$) (color online).

表 1 CA与FA间分离距离和FRET效率**Table 1** FRET efficiency and separation distance for the fluorophores in the absence and presence of CD44

样品名称	FRET效率 E_{FRET} (%)	分离距离 R (Å)
EuL ³⁺ /CA/HA-FA	57	23
EuL ³⁺ /CA/HA-FA +CD44	38	27

3.3 对CD44蛋白的传感识别

为了测试该荧光纳米界面(EuL³⁺/CA/HA-FA)对CD44蛋白的传感性能, 测试了不同浓度CD44蛋白($8.0 \times 10^{-7} \sim 2.16 \times 10^{-5}$ g/mL)存在下该传感体系的荧光发射光谱, 结果如图5(a)所示. 从图中可以看出, 随着CD44蛋白浓度的增加, FA的荧光发射强度(I_{524})逐渐下降, 与此相反, CA的荧光强度(I_{448})则逐渐增加, 实现了对CD44蛋白的比例型传感. 其原因为HA和CD44蛋白之间的特异性结合^[9~11]拉大了能量给体CA和能量受体FA之间的距离($R=27$ Å, 表1, 详见补充材料), 降低了EuL³⁺/CA和HA-FA之间的FRET效率($E_{\text{FRET}}=38\%$, 表1). 此外, 在UV光照射下可用肉眼直接观察到溶液的荧光从绿色(1, 图5(a)中的插图)转变为蓝色(2, 图5(a)中的插图). 荧光强度比值(I_{448}/I_{524})与CD44蛋白浓度具有良好的线性关系($R^2=0.997$), 计算可得该荧光纳米界面对CD44蛋白的检出限(detection limit, DL)为

1.79×10^{-7} g/mL (图5(b), 计算过程见补充材料).

生命体系中存在着不同种类的氨基酸、糖、蛋白质等生物分子, 要实现生物分子的原位精准检测须确保荧光探针具有良好的选择性, 因此, 我们考察了荧光纳米界面EuL³⁺/CA/HA-FA对细胞中常见生物分子的响应情况, 将波长为524和448 nm处的荧光强度比值定义为 $F=I_{524}/I_{448}$, $K=(F_0-F)/F$, 结果如图6所示. 从图6可以看出, 除了CD44蛋白外, 所测试的氨基酸、蛋白质等细胞中常见的生物分子几乎不会荧光纳米界面的荧光性质产生影响, 表明所制备的囊泡纳米界面在CD44蛋白检测中具备良好的抗干扰能力, 其原因为透明质酸与CD44蛋白间存在特异性结合^[9,10], 拉大了CA与FA之间的距离, 降低了二者之间的能量转移效率, 导致FA的荧光发射强度大幅下降, 而CA的荧光发射强度大幅增加. 基于此, 我们提出荧光纳米界面EuL³⁺/CA/HA-FA对CD44蛋白的传感机制(图1), 如图1所示, EuL³⁺与CA共组装形成带正电的囊泡型纳米界面, 该界面的荧光发射为蓝色, 带负电的HA-FA通过静电相互作用络合到纳米界面上, 缩小了FA与CA之间的距离, 导致二者之间发生有效的荧光共振能量转移, 体系荧光发射从蓝色转变为绿色. 向体系中加入CD44蛋白时, HA与CD44蛋白之间的特异相互作用导致FA与CA之间的距离增大, 二者之间的FRET效率降低, 体系的荧光发射则从绿色转变为蓝光, 实现了对CD44蛋白的高灵敏检测.

图 5 (a) EuL³⁺/CA/HA-FA在不同CD44蛋白浓度下的荧光发射光谱, $\lambda_{\text{ex}}=405$ nm; EuL³⁺, CA, HA-FA以及Tris-HCl缓冲液(pH=8.0)的浓度分别为100 $\mu\text{mol/L}$, 6 $\mu\text{mol/L}$, 4.5 mg/L和10 mmol/L. (a)中的插图为加入CD44前后365 nm紫外光照射下EuL³⁺/CA/HA-FA溶液的照片; (b) 荧光强度比(I_{448}/I_{524})对CD44蛋白浓度的线性关系图($y=0.00519x+0.410$, $R^2=0.997$) (网络版彩图)

Figure 5 (a) Fluorescence emission spectra of the sensing system in the presence of increasing concentrations of CD44, $\lambda_{\text{ex}}=405$ nm. The concentration of EuL³⁺, CA and HA-FA was 100 $\mu\text{mol/L}$, 6 $\mu\text{mol/L}$, and 4.5 mg/L, respectively, in 10 mmol/L Tris-HCl buffer (pH = 8.0). The inset shows the photograph of the samples under a 365 nm UV lamp. (b) Plots of fluorescence intensity ratio (I_{448}/I_{524}) against CD44 concentrations ($y=0.00519x+0.410$, $R^2=0.997$) (color online).

图 6 荧光纳米界面 $\text{EuL}^{3+}/\text{CA}/\text{HA-FA}$ 对不同生物分子的响应情况: (1) 精氨酸, (2) 赖氨酸, (3) 谷氨酸, (4) 天冬氨酸, (5) 丙氨酸, (6) 丝氨酸, (7) AMP, (8) 细胞色素C, (9) 溶菌酶, (10) 胰蛋白酶, (11) CD44. EuL^{3+} , CA, HA-FA以及Tris-HCl缓冲液(pH=8.0)的浓度分别为100 $\mu\text{mol/L}$, 6 $\mu\text{mol/L}$, 4.5 mg/L和10 mmol/L. 分析物的浓度为 2.16×10^{-5} g/mL, $\lambda_{\text{ex}}=405$ nm. $K=(F_0-F)/F$, $F=I_{524}/I_{448}$, 其中 F_0 和 F 分别为加入分析物前后不同波长处荧光强度的比值(网络版彩图)

Figure 6 Fluorescence responses of the FRET-based supramolecular fluorescent probe to various species: (1) arginine, (2) lysine, (3) glutamate, (4) asparagic acid, (5) alanine, (6) serine, (7) AMP, (8) cytochrome C, (9) lysozyme, (10) trypsin, (11) CD44. The concentration of EuL^{3+} , CA and HA-FA was 100 $\mu\text{mol/L}$, 6 $\mu\text{mol/L}$, and 4.5 mg/L respectively in 10 mmol/L Tris-HCl buffer (pH = 8.0). The concentration of the test analyte is 2.16×10^{-5} g/mL, $\lambda_{\text{ex}}=405$ nm. $K=(F_0-F)/F$, $F=I_{524}/I_{448}$, where F_0 and F are the fluorescence intensity ratio of the sensing system in the absence and presence of CD44, respectively (color online).

CD44蛋白通常在人乳腺癌细胞表面有着过度表达, 如MCF-7和MDA-MB-231^[25,26], 鉴于荧光纳米界面

$\text{EuL}^{3+}/\text{CA}/\text{HA-FA}$ 对CD44蛋白的特异识别, 我们将 $\text{EuL}^{3+}/\text{CA}/\text{HA-FA}$ 用于对癌细胞MCF-7和MDA-MB-231中CD44蛋白的检测, 实验结果如图7所示. 从图7可以看出, 加入癌细胞悬浮液后, 524 nm处荧光强度减弱而448 nm处强度增强($\lambda_{\text{ex}}=405$ nm), 该结果与图5(a)所示实验结果基本一致, 表明该荧光纳米界面可用于癌细胞悬浮液中CD44蛋白的高效检测, 并有望用于血液中CD44蛋白的检测, 为发展癌症早期诊断策略提供了思路.

4 结论

本工作设计合成了两亲性 Eu^{3+} 配合物(EuL^{3+})、两亲性香豆素衍生物(CA)以及荧光素修饰的透明质酸(FA), 利用 EuL^{3+} 与CA的共组装构建了平均直径约为130 nm的囊泡型荧光纳米界面($\text{EuL}^{3+}/\text{CA}$). HA-FA可通过静电相互作用络合在 $\text{EuL}^{3+}/\text{CA}$ 表面, 拉近了CA与FA之间的距离($R=23$ Å), 二者发生了有效的荧光共振能量转移($E_{\text{FRET}}=57\%$), 体系的荧光发射以FA的绿色荧光为主. 当肿瘤细胞标识物CD44蛋白与络合在囊泡表面上的透明质酸发生特异相互作用后, 拉大了CA与FA之间的距离($R=27$ Å), 进而降低了二者之间的能量转移效率($E_{\text{FRET}}=38\%$), 体系的荧光发射从绿色转变为蓝色. 据此, 实现了对CD44蛋白的高灵敏检测($\text{DL}=1.79 \times 10^{-7}$ g/mL). 而所测试的其他氨基酸、蛋白质等细胞中常见的生物分子几乎不对上述荧光纳米界面的

图 7 荧光纳米界面 $\text{EuL}^{3+}/\text{CA}/\text{HA-FA}$ 对MCF-7 (a)和MDA-MB-231 (b)癌细胞的响应情况. $\text{EuL}^{3+}/\text{CA}$ 和HA-FA的浓度分别为100 $\mu\text{mol/L}$, 6 $\mu\text{mol/L}$ 和4.5 mg/L, $\lambda_{\text{ex}}=405$ nm. 细胞悬浮液: 5200个细胞/mL (DMEM) (网络版彩图)

Figure 7 Fluorescence responses of the FRET-based supramolecular assembly, $\text{EuL}^{3+}/\text{CA}/\text{HA-FA}$, to cancer cell lines. (a): MCF-7 cell lines, (b): MDA-MB-231 cell lines. The concentration of EuL^{3+} , CA and HA-FA was 100 $\mu\text{mol/L}$, 6 $\mu\text{mol/L}$ and 4.5 mg/L respectively, $\lambda_{\text{ex}}=405$ nm. Cell suspension: 5200 cells/mL (DMEM) (color online).

荧光性质产生影响. 基于此, 我们成功地将EuL³⁺/CA/HA-FA用于人乳腺癌细胞MCF-7和MDA-MB-231悬浮液中CD44蛋白的高效检测, 为癌症早期诊断和治疗奠定了基础, 期望该工作将有助于相关领域研究的发展.

补充材料

本文的补充材料见网络版<http://chemcn.scichina.com>. 补充材料为作者提供的原始数据, 作者对其学术质量和内容负责.

参考文献

- 1 Bos JL. *Cancer Res*, 1989, 49: 4682–4689
- 2 Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. *CA-A Cancer J Clin*, 2011, 61: 69–90
- 3 Zhang LS, Mummert ME. *Anal Biochem*, 2008, 379: 80–85
- 4 Naor D, Nedvetzki S, Golan I, Melnik L, Faitelson Y. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2002, 39: 527–579
- 5 Nakamura K, Sawada K, Kinose Y, Yoshimura A, Toda A, Nakatsuka E, Hashimoto K, Mabuchi S, Morishige KI, Kurachi H, Lengyel E, Kimura T. *Mol Cancer Res*, 2017, 15: 78–92
- 6 Matsumura Y, Hanbury D, Smith J, Tarin D. *BMJ*, 1994, 308: 619–624
- 7 Li H, Guo L, Li JW, Liu N, Qi R, Liu J. *Int J Oncol*, 2000: 927–959
- 8 Woodman AC, Goodison S, Drake M, Noble J, Tarin D. *Clin Cancer Res*, 2000, 6: 2381–2392
- 9 Huang Y, Yao X, Zhang R, Ouyang L, Jiang R, Liu X, Song C, Zhang G, Fan Q, Wang L, Huang W. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2014, 6: 19144–19153
- 10 Jia T, Fu C, Huang C, Yang H, Jia N. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2015, 7: 10013–10021
- 11 Zhang M, Fang Z, Zhao X, Niu Y, Lou J, Zhao L, Wu Y, Zou S, Du F, Shao Q. *RSC Adv*, 2016, 6: 104979–104984
- 12 Peng HS, Chiu DT. *Chem Soc Rev*, 2015, 44: 4699–4722
- 13 Chen X, Zhou G, Peng X, Yoon J. *Chem Soc Rev*, 2012, 41: 4610–4630
- 14 Mako TL, Racicot JM, Levine M. *Chem Rev*, 2019, 119: 322–477
- 15 Liu K, Kang Y, Wang Z, Zhang X. *Adv Mater*, 2013, 25: 5530–5548
- 16 Lei H, Liu J, Yan J, Lu S, Fang Y. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2014, 6: 13642–13647
- 17 Lei H, Liu J, Yan J, Quan J, Fang Y. *Langmuir*, 2016, 32: 10350–10357
- 18 Hessels AM, Merckx M. *ACS Sens*, 2016, 1: 498–502
- 19 Sun J, Hua B, Li Q, Zhou J, Yang J. *Org Lett*, 2018, 20: 365–368
- 20 Yuan L, Lin W, Zheng K, Zhu S. *Acc Chem Res*, 2013, 46: 1462–1473
- 21 Liu J, Morikawa M, Kimizuka N. *J Am Chem Soc*, 2011, 133: 17370–17374
- 22 Prevo B, Peterman EJG. *Chem Soc Rev*, 2014, 43: 1144–1155
- 23 Sahoo H. *J PhotoChem PhotoBiol C-PhotoChem Rev*, 2011, 12: 20–30
- 24 Medintz IL, Clapp AR, Brunel FM, Tiefenbrunn T, Tetsuo Uyeda H, Chang EL, Deschamps JR, Dawson PE, Mattoussi H. *Nat Mater*, 2006, 5: 581–589
- 25 Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 3983–3988
- 26 Li C, Heidt DG, Dalerba P, Burant CF, Zhang L, Adsay V, Wicha M, Clarke MF, Simeone DM. *Cancer Res*, 2007, 67: 1030–1037

Fluorescent vesicular nanointerface: construction and ratiometric sensing behavior toward CD44 protein

Jianan Xue, Hairui Lei, Mukherjee Somnath, Dan Yang, Junlin Yan, Jing Liu^{*}, Yu Fang

Key Laboratory of Applied Surface and Colloid Chemistry, Ministry of Education; School of Chemistry & Chemical Engineering, Shaanxi Normal University, Xi'an 710119, China

**Corresponding author (email: jliu@snnu.edu.cn)*

Abstract: A fluorescent vesicular nanointerface for CD44 protein sensing has been achieved by using amphiphilic Eu^{3+} complexes and derivatives of a pair of fluorophores, fluorescein and coumarin. Both Eu^{3+} complex and coumarin were designed to have hydrophobic tails, which facilitated their co-assembly to form vesicles ($\text{EuL}^{3+}/\text{CA}$). The negatively charged fluorescein-labeled hyaluronic acid (HA-FA) could bond onto $\text{EuL}^{3+}/\text{CA}$ surface via coulombic interaction. The vesicles usually emit in the blue region, but they exhibited green fluorescence after HA-FA was bonded to the vesicle surface. This is due to the fluorescence resonance energy transfer (FRET) process between coumarin and fluorescein. As the CD44 protein was introduced to the system, intensity of the green emission of the assembly decreased, while the blue emission enhanced. This phenomenon is accounted for the specific binding between CD44 and hyaluronic acid thereby prohibiting the FRET process between HA-FA and $\text{EuL}^{3+}/\text{CA}$. The vesicular nanointerface was found to be sensitive and selective to CD44 sensing ($\text{DL}=0.179 \mu\text{g/mL}$) while the amino acids and proteins tested did not affect the fluorescent properties of the assembly. What is more, the assembly could not only be used to detect CD44 in buffer solution, but also be applied to detect CD44 in cancer cells.

Keywords: self-assembly, vesicle, fluorescence, ratiometric sensing, CD44 protein

doi: [10.1360/SSC-2019-0086](https://doi.org/10.1360/SSC-2019-0086)