

新型水溶性不对称五甲川吡啶菁染料的合成、荧光性能及荧光标记

汤 昆^a 邱 娜^a 吴 品^c 贾春辉^{a,b} 王 升^b 张付利^{a*}

(^a 河南大学医学院环境医学研究所 开封 475004; ^b 河南大学药学院 开封 475004;

^c 河南晋开化工投资控股集团有限责任公司二分公司 开封 475100)

摘 要 合成了枝状聚乙二醇醚链取代的新型不对称五甲川吡啶菁荧光染料,利用¹H NMR、HRMS 等技术手段表征了化合物的结构,并测定了染料的荧光性能、光稳定性,标示了牛血清白蛋白。结果表明,该染料的最大吸收波长为 657 nm,最大荧光发射波长为 671 nm,荧光量子产率为 0.24,经过 8 h 的光照反应,染料有 4.4% 产生光降解,溶于水, $n(\text{染料}):n(\text{牛血清白蛋白})=2:1$ 时,标记蛋白质的染料/蛋白质(D/P)值达 1.57。

关键词 吡啶菁染料,五甲川,荧光标记,枝状化合物,牛血清白蛋白,荧光量子产率

中图分类号:O621

文献标识码:A

文章编号:1000-0518(2014)11-1255-06

DOI:10.3724/SP.J.1095.2014.30661

吡啶菁染料具有光谱范围广(550 ~ 1200 nm)、高荧光量子产率、高光稳定性、高选择性和高灵敏度等特性,是性能优良的荧光标记染料,广泛应用于蛋白质^[1-4]、核酸^[5-7]及其它生物分子的标记和检测^[8-11]。尤其是五甲川菁染料在生物标记中可有效的避开生物自荧光的干扰,提高信噪比;而单侧引入羧基的不对称菁染料,更具有标记产物组成简单,有利于荧光分析检测和定量转化等优点。但不对称菁染料的合成复杂,副反应多,副产物极性相近,产物的分离提纯困难,收率低。我们合成了一种水溶性不对称吡啶菁染料,该染料在吡啶“N”上引入了一个非离子水溶性基团,使产物的分离提纯比较简单,用自制 C18 反相硅胶填料分离柱即可得到高纯染料,染料的荧光量子产率、光稳定性、水溶性、标记蛋白质的标记率等均大幅提高,在生物标记领域有广泛的应用前景。

1 实验部分

1.1 试剂和仪器

4-磺酸基苯肼(分析纯,太仓华联化工实业有限公司);3-甲基-2-丁酮(分析纯,上海萨恩化学技术有限公司);对甲苯磺酰氯(分析纯,上海阿拉丁试剂);三乙二醇单甲醚(分析纯,上海东京化成工业株式会社);罗丹明 B(优级纯,上海梯希爱化成工业发展有限公司);2-琥珀酰亚胺基-1,1,3,3-四甲基脲四氟硼酸盐(分析纯,天津 Alfa Aesar 试剂);三乙胺(分析纯,天津 Alfa Aesar 试剂);牛血清白蛋白(Biosharp);C18 反相柱填料(48 ~ 75 μm ,西安交大保赛生物技术股份有限公司)。

PE-Lambda35 型双通道紫外-可见分光光度计(美国珀金埃尔默仪器责任有限公司);FluoroSENS 型稳态荧光光谱仪(英国 Gilden 公司);AVANCE-400MHz 型核磁共振仪(瑞士布鲁克公司);ESQUIRE-LC/Agilent1100型液相色谱-质谱联用仪(德国布鲁克公司/美国安捷伦公司);MICROTOF-Q II 型电喷雾四级杆飞行时间质谱仪(德国 BRUKER 公司)。

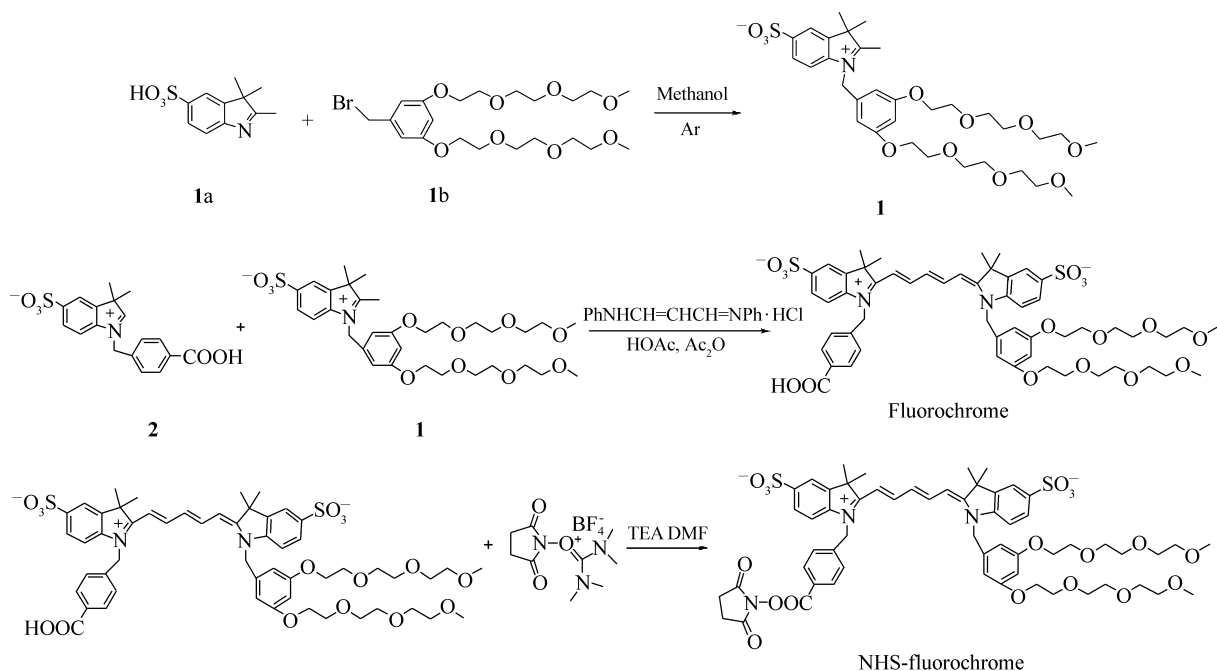
1.2 实验方法

化合物的合成路线如 Scheme 1 所示。

2013-12-26 收稿,2014-03-19 修回,2014-04-29 接受

国家自然科学基金(21202036)资助项目

通讯联系人:张付利,教授;Tel/Fax:0371-23880585;E-mail:hdzfl508@163.com;研究方向:有机合成



Scheme 1 Synthetic routes of the title compounds

1.2.1 *N*-(3,5-二(2-(2-甲氧乙氧基)乙氧基)苄基)-2,3,3-三甲基-5-磺酸基-3*H*-吡啶(中间体 **1**)的合成 中间体 **1a** 参照文献[12-14]方法合成,中间体 **1b** 参照文献[15-16]方法合成。

在 50 mL 三颈瓶中依次加入 30 mL 甲醇、1.0 g(约 4.2 mmol)中间体 **1a**、适量乙酸钾及 2.1 g(约 4.2 mmol)中间体 **1b**, N_2 气保护下回流反应 36.0 h,反应结束后,旋蒸出甲醇,以体积比为 1:4 的甲醇/二氯甲烷混合溶剂为洗脱剂,用硅胶填料分离柱分离,得红色固体 2.0 g,收率 76%。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$), δ : 7.40(d, 1H, $J=1.6$ Hz, 4-H), 7.35(dd, 1H, $J=8.4, 1.6$ Hz, 6-H), 6.55(d, 1H, $J=8.4$ Hz, 7-H), 6.38(t, 1H, $J=2.0$ Hz, O—Ar—H), 6.35(d, 2H, $J=2.0$ Hz, O—Ar—H), 4.68(s, 2H, Ar— CH_2 —), 3.99(t, 4H, $J=4.8$ Hz, Ar—O— CH_2 —), 3.68(t, 4H, $J=4.8$ Hz, Ar—O— CH_2CH_2 —), 3.59~3.39(m, 16H, O— C_2H_4 —O— C_2H_4 —O), 3.34(s, 3H, $\text{N}=\text{C}-\text{CH}_3$), 3.22(s, 6H, —O— CH_3), 1.32(s, 6H, — CH_3); m/z : 654.3 [$\text{M} + \text{H}$] $^+$ 。

1.2.2 吡啶菁染料的合成 中间体 **2** 按文献[17-18]方法合成。

在 50 mL 三颈瓶中依次加入 6.0 mL 乙酸、6.0 mL 乙酸酐、0.56 g(约 1.5 mmol)中间体 **2**、0.39 g(约 1.5 mmol) β -苯胺基丙烯醛缩苯胺盐酸盐、0.98 g(约 1.5 mmol)中间体 **1**, N_2 气保护下 90 $^\circ\text{C}$ 反应 2.0 h。反应结束后冷却至室温,加入 100 mL 乙酸乙酯析出固体,抽滤,用 C18 反相填料分离柱分离,流动相为 $V(\text{甲醇}):V(\text{乙腈})=1:2$,得深蓝色固体 1.3 g,收率 72%。样品配制成 100 mg/L 甲醇溶液,采用岛津 LC-20A 高效液相色谱仪进样分析,色谱柱为 Inertsil ODS-SP(C_{18} , 5 μm , 4.6×250 mm),进样量为 2 μL ,流速为 1.0 mL/min。以乙腈+甲醇为流动相梯度洗脱(乙腈 100%, 3 min; 100%~0%, 10 min; 0%, 5 min),650 nm 波长检测。根据峰面积归一法计算产品的纯度高于 98%。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$), δ : 8.41(t, 2H, β proton of the bridge), 7.91(d, 2H, $J=8.0$ Hz, —OOC—Ar—H), 7.88(d, 1H, $J=1.6$ Hz, 4-H), 7.87(d, 1H, $J=1.6$ Hz, 4'-H), 7.60(dd, 1H, $J=8.4, 1.6$ Hz, 6-H), 7.58(dd, 1H, $J=8.4, 1.6$ Hz, 6'-H), 7.28(d, 2H, $J=8.0$ Hz, —OOC—Ar—H), 7.23(d, 2H, $J=8.4$ Hz, 7, 7'-H), 6.33~6.48(m, 6H, O—Ar—H, α, γ proton of the bridge), 5.54(s, 2H, CH_2 —Ar—COOH), 5.28(s, 2H, CH_2 —Ar—O), 4.01(t, 4H, $J=4.8$ Hz, Ar—O— CH_2 —), 3.68(t, 4H, $J=4.8$ Hz, Ar—O— CH_2CH_2 —), 3.52~3.38(m, 16H, O— C_2H_4 —O— C_2H_4 —O), 3.20(s, 6H, O— CH_3), 1.74(s, 12H, — CH_3); HRMS(ESI): $\text{C}_{54}\text{H}_{67}\text{N}_2\text{O}_{16}\text{S}_2^+$ 计算值: 1063.3927, 实测值: 1063.3924。

1.2.3 吡啶菁染料的活化 在 50 mL 三颈瓶中依次加入 30.0 mg (0.0263 mmol) 染料, 12.0 mg (0.0395 mmol) 2-琥珀酰亚胺基-1,1,3,3-四甲基脲四氟硼酸酯, 13.0 μL (0.0921 mmol) 三乙胺, 3 mL 无水无氨 DMF, 用锡纸包裹三颈瓶, Ar 气保护下室温反应 2.0 h, 反应结束后, 将反应液加入到 100 mL 二氯乙烷中, 析出蓝色沉淀, 抽滤, 真空干燥, 得活化过的荧光染料, 可直接用于生物标记, 收率 98%。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6), δ : 8.41 (t, 2H, β proton of the bridge), 7.91 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, $-\text{OOC}-\text{Ar}-\text{H}$), 7.88 (d, 1H, $J = 1.6$ Hz, 4-H), 7.87 (d, 1H, $J = 1.6$ Hz, 4'-H), 7.60 (dd, 1H, $J = 8.4$, 1.6 Hz, 6-H), 7.58 (dd, 1H, $J = 8.4$, 1.6 Hz, 6'-H), 7.28 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, $-\text{OOC}-\text{Ar}-\text{H}$), 7.23 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz, 7, 7'-H), 6.33 ~ 6.48 (m, 6H, O—Ar—H, α , γ proton of the bridge), 5.54 (s, 2H, $\text{CH}_2-\text{Ar}-\text{COOH}$), 5.28 (s, 2H, $\text{CH}_2-\text{Ar}-\text{O}$), 4.01 (t, 4H, $J = 4.8$ Hz, $\text{Ar}-\text{O}-\text{CH}_2$), 3.68 (t, 4H, $J = 4.8$ Hz, $\text{Ar}-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.52 ~ 3.38 (m, 16H, $\text{O}-\text{C}_2\text{H}_4-\text{O}-\text{C}_2\text{H}_4-\text{O}$), 3.20 (s, 6H, $\text{O}-\text{CH}_3$), 2.64 (s, 4H, $\text{O}=\text{C}-\text{CH}_2$), 1.74 (s, 12H, $-\text{CH}_3$); HRMS (ESI): $\text{C}_{58}\text{H}_{70}\text{N}_3\text{O}_{18}\text{S}_2^+$ 计算值: 1160.4090, 实测值: 1160.4087。

1.2.4 紫外吸收光谱和荧光光谱的测定 将染料分别配成浓度为 2×10^{-4} mol/L 的水溶液和 DMF 溶液, 测定紫外-可见吸收光谱和荧光光谱。以罗丹明 B 在乙醇中的荧光量子产率 ($\Phi = 0.56$)^[19] 为参比, 按式(1)^[20] 计算染料的荧光量子产率:

$$\Phi_x = \Phi_s (A_s/A_x) (F_x/F_s) (\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{ex}}) (\eta_x/\eta_s)^2 \quad (1)$$

式中, Φ_x 为菁染料的荧光量子产率, Φ_s 为罗丹明 B 在乙醇中的荧光量子产率, A_x 为菁染料在激发波长处的吸光度, A_s 为罗丹明 B 在激发波长处的吸光度, F_x 为菁染料荧光发射光谱曲线的积分面积, F_s 为罗丹明 B 荧光发射光谱曲线的积分面积, λ_{ex} 为测量荧光发射光谱时的激发波长, η_x 、 η_s 分别为菁染料所用溶剂和罗丹明 B 所用溶剂的折光率。

1.2.5 光稳定性测定 染料样品配成 1×10^{-5} mol/L 的水溶液, 放在吸收池中密封, 将 500 W 碘钨灯放在样品池正前方 30 cm 处, 中间放置一个盛有 50 g/L 亚硝酸钠水溶液的玻璃展开缸, 碘钨灯照射下, 每隔 1.0 h 测一次吸光度值。以“相对吸光度”为纵坐标, “照射时间”为横坐标作染料光降解曲线。

1.2.6 标记蛋白质 标记物溶于无水无氨的 DMF 中, 配成浓度为 10 g/L 的溶液; 牛血清白蛋白溶于 0.1 mol/L NaHCO_3 缓冲溶液中, 配成浓度为 24 g/L 的溶液。将两溶液混合, 室温下搅拌反应 1.0 h, 反应结束后, 过 G-25 葡聚糖凝胶柱, 分出牛血清白蛋白, 测量 280 和 650 nm 下的吸光度按式(2)^[21] 计算标记蛋白质的染料/蛋白质 (D/P) 值:

$$\frac{D}{P} = 0.24 \times \frac{A_{\text{dye}}}{A_{280} - 0.08A_{\text{dye}}} \quad (2)$$

2 结果与讨论

2.1 中间体 1 的合成

中间体 1 的合成中, 有机酸钾盐对反应起到至关重要的作用。有机酸钾盐提供了一个弱碱性反应环境, 提高了吡啶“N”的亲核能力, 对其与苄溴的反应起到催化作用; 有机酸钾盐与吡啶磺酸中的磺酸基成盐, 可以除去磺酸基结合的铵离子, 避免活化时降低染料的琥珀酰亚胺酯的活化率。

2.2 新型吡啶菁染料的合成

不对称菁染料的合成一般有“一步法”和“半菁合成法”, “一步法”合成步骤少, 操作简单, 但条件控制不好, 对称副产物生成的量会比较多, “半菁合成法”操作相对复杂, 但便于对主产物的控制。控制 n (中间体 1): n (缩合剂): n (中间体 2) = 1:1:1, 中间体 1 和缩合剂反应充分后, 再加入中间体 2, 用“一步法”得到了较好的合成结果, 收率也比较高, 避免了“两步法”中繁琐的提纯分离操作。可能是因为枝状聚乙二醇 (PEG) 醚链的体积比较大, 生成对称副产物较为困难。

2.3 产物的分离纯化

水溶性菁染料通常是通过引入离子型水溶性基团 (如磺酸基) 增大其水溶性, 由于产物极性大, 主产物和副产物的极性差别小, 产物分离非常困难。而新型吡啶菁荧光染料中, 吡啶“N”原子上引入了一

个体积比较大的非离子水溶性基团,使染料与副产物的结构和极性差别增大,大大降低了分离难度,用自行设计、装填的简易 C18 反相硅胶分离柱即可得到的纯品。

2.4 新型吡啶菁染料的光谱性质

以水和 DMF 为溶剂,新型吡啶菁染料的紫外吸收光谱和荧光发射光谱见图 1,主要光谱性能见表 1。从表 1 可以看出,染料在不同溶剂中的最大吸收波长和最大发射波长均在近红外区(650 ~ 700 nm),且随着溶剂极性的减小,染料的最大吸收和发射波长发生了红移,同时斯托克斯位移(Stokes shift)增大,荧光量子产率增大。可能是由于弱极性溶剂对分子激发态的溶剂效应增强,有利于激发态稳定的原因^[22]。

表 1 新型染料在不同溶剂中的光谱性质

Table 1 UV-visible absorption and emission spectra properties of the title compound in different solvents

Dye	Solvent	λ_{ab}/nm	λ_{em}/nm	Stokes shifts/nm	$\varepsilon \times 10^5 / (mol^{-1} \cdot L \cdot cm^{-1})$	Φ
the title compound	H ₂ O	657	671	14	1.6	0.24
	DMF	670	690	20	1.4	0.35

以水为溶剂,染料的光量子产率也在 0.2 以上,明显高于一般的水溶性菁染料,如 *N*-对羧苄基-2,3,3-三甲基-5-磺酸基-3*H*-吡啶-*N*-磺酸丁基-2,3,3-三甲基-5-磺酸基-3*H*-五甲川菁染料(参比染料)在水中的光量子产率在 0.1 左右。原因可能是新型吡啶菁染料中,吡啶“N”原子上引入的枝状 PEG 醚链所引起,枝状 PEG 醚链的弱亲水性,增大了染料的水溶性,降低了染料在水中自聚而导致的荧光自淬灭,提高了光量子产率。

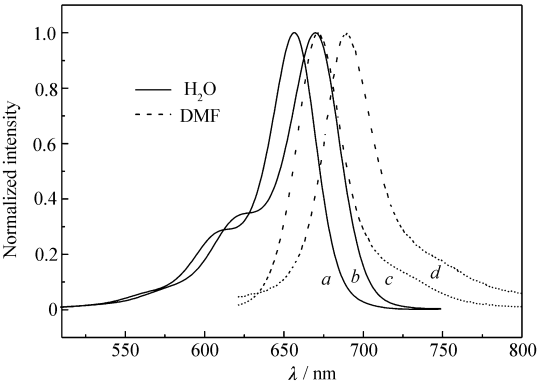


图 1 新型染料在水和 DMF 中的紫外吸收光谱和荧光发射光谱

Fig. 1 Absorption and fluorescence emission spectra of the title compound in water and DMF

a, c. absorption spectroscopy; *b, d.* emission spectroscopy

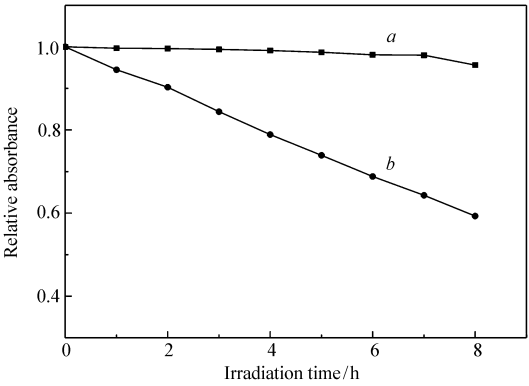


图 2 染料光稳定性对照图

Fig. 2 Comparison on the photofading of the dyes
a. the title compound; *b.* reference dye

2.5 染料的光稳定性

染料的光稳定性如图 2 所示,经过 8 h 光照反应,新型吡啶菁染料在水中的光降解率为 4.4%,而参比染料的光降解率为 41.7%。影响荧光染料光稳定性的原因主要有两方面:一是单线态氧进攻聚甲川链,使光稳定性降低;二是染料中离子之间相互作用,发生自聚集。新型吡啶菁染料中,吡啶“N”上枝状 PEG 醚链的扇形结构可以从空间上抑制单线态氧对聚甲川链的进攻,抑制离子之间的自聚集作用。

2.6 蛋白质的荧光标记

蛋白质、核酸和其它生物聚合物通过标记上荧光染料分子,在免疫学、组织化学和细胞生物学方面已经成为一个功能强大的研究工具,五甲川菁染料的活性基团一般为羧基,利用羧基形成的琥珀酰亚胺酯实现与生物聚合物的共价结合。本文利用 2-琥珀酰亚胺基-1,1,3,3-四甲基脲四氟硼酸酯作为活化剂,活化后的标记物与牛血清白蛋白的物质的量之比为 2:1 时,标记蛋白质的 *D/P* 值达 1.57。可见,新型吡啶菁染料对蛋白质有较高的标记率。在生物标记中,标记蛋白质最适合应用的 *D/P* 值为 1.0 ~

2. 0^[23], 应用结果表明, 新型吡啶菁染料标记的蛋白质具有稳定性好、灵敏度高和荧光强度高等优点。

3 结 论

设计合成了一种新型水溶性不对称吡啶菁荧光标记物, 目标化合物采用“一步法”合成, 用自制 C18 反相硅胶柱分离即可得到纯品; 工艺简便, 分离简单, 重复性好, 收率高, 可以实现批量生产。目标化合物在“N”原子上引入一个非离子水溶性基团, 使其既有水溶性, 又有一定的脂溶性, 且荧光量子产率高, 光稳定好, 对蛋白质、抗体等有很好的标记效果, 在生物标记领域有很广泛的应用前景。

参 考 文 献

- [1] Romieu A, Brossard D, Hamon M, *et al.* Postsynthetic Derivatization of Fluorophores with α -Sulfo- β -alanine Dipeptide Linker. Application to the Preparation of Water-soluble Cyanine and Rhodamine Dyes[J]. *Bioconjugate Chem*, 2007, **19**(1): 279-289.
- [2] Bouteiller C, Clavé G, Bernardin A, *et al.* Novel Water-soluble Near-infrared Cyanine Dyes: Synthesis, Spectral Properties, and Use in the Preparation of Internally Quenched Fluorescent Probes[J]. *Bioconjugate Chem*, 2007, **18**(4): 1303-1317.
- [3] Xin J, Zhang X, Liang J, *et al.* *In Vivo* Gastric Cancer Targeting and Imaging Using Novel Symmetric Cyanine Dye-conjugated GX1 Peptide Probes[J]. *Bioconjugate Chem*, 2013, **24**(7): 1134-1143.
- [4] Tung C H. Fluorescent Peptide Probes for *in Vivo* Diagnostic Imaging[J]. *Pept Sci*, 2004, **76**(5): 391-403.
- [5] Thompson M. Synthesis, Photophysical Effects, and DNA Targeting Properties of Oxazole Yellow-peptide Bioconjugates[J]. *Bioconjugate Chem*, 2006, **17**(2): 507-513.
- [6] Lee S, Lee J, Hohng S. Single-molecule Three-color FRET with Both Negligible Spectral Overlap and Long Observation Time[J]. *PLoS One*, 2010, **5**(8): e12270.
- [7] Nanjunda R, Owens E A, Mickelson L, *et al.* Halogenated Pentamethine Cyanine Dyes Exhibiting High Fidelity for G-quadruplex DNA[J]. *Bioorg Med Chem*, 2012, **20**(24): 7002-7011.
- [8] White A G, Gray B D, Pak K Y, *et al.* Deep-red Fluorescent Imaging Probe for Bacteria[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2012, **22**(8): 2833-2836.
- [9] Ge J F, Zhang Q Q, Lu J M, *et al.* Synthesis of Cyanine Dyes and Investigation of Their *in Vitro* Antiprotozoal Activities[J]. *MedChemComm*, 2012, **3**(11): 1435-1442.
- [10] Fu N, Xiong Y, Squier T C. Optimized Design and Synthesis of a Cell-Permeable Biarsenical Cyanine Probe for Imaging Tagged Cytosolic Bacterial Proteins[J]. *Bioconjugate Chem*, 2013, **24**(2): 251-259.
- [11] Pauli J, Licha K, Berkemeyer J, *et al.* New Fluorescent Labels with Tunable Hydrophilicity for the Rational Design of Bright Optical Probes for Molecular Imaging[J]. *Bioconjugate Chem*, 2013, **24**(7): 1174-1185.
- [12] Mujumdar R B, Ernst L A, Mujumdar S R, *et al.* Cyanine Dye Labeling Reagents: Sulfoindocyanine Succinimidyl Esters[J]. *Bioconjugate Chem*, 1993, **4**(2): 105-111.
- [13] Wang L, Peng X, Zhang R, *et al.* Syntheses and Spectral Properties of Fluorescent Trimethine Sulfo-3 H-indocyanine Dyes[J]. *Dyes Pigm*, 2002, **54**(2): 107-111.
- [14] WANG Li, DAI Bin, PENG Xiaojun, *et al.* Novel Water-soluble Asymmetric Cy5 Dyes: Synthesis, Photo-stabilities and Fluorescent Labeling Protein[J]. *Chem J Chinese Univ*, 2010, **31**(7): 1381-1385 (in Chinese).
王丽, 戴彬, 彭孝军, 等. 新型水溶性不对称五甲川菁染料的合成、光稳定性及蛋白质的荧光标记[J]. 高等学校化学学报, 2010, **31**(7): 1381-1385.
- [15] Rio Y, Nicoud J F, Rehspringer J L, *et al.* Fullerodendrimers with Peripheral Triethyleneglycol Chains[J]. *Tetrahedron Lett*, 2000, **41**(52): 10207-10210.
- [16] Hannon M J, Mayers P C, Taylor P C. Synthesis and Characterisation of Water-soluble Poly(aryl ether) Dendrimers for Encapsulation of Biomimetic Active Site Analogues[J]. *J Chem Soc, Perkin Trans 1*, 2000, (12): 1881-1889.
- [17] SONG Bo, YU Hao, Peng Xiaojun, *et al.* Synthesis of Near-infrared Water-soluble Asymmetrical Squarylium Indocyanine Dyes[J]. *Acta Chim Sin*, 2010, **68**(24): 2569-2573 (in Chinese).
宋波, 于浩, 彭孝军, 等. 近红外水溶性不对称吡啶菁染料的合成[J]. 化学学报, 2010, **68**(24): 2569-2573.
- [18] CHEN Xiuying, ZHAO Xiaoqin, ZHENG Changge. Research on Synthesis and Properties of Novel 3 H-indolenine Fluorescent Cyanine Dyes[J]. *Imaging Sci Photochem*, 2008, **26**(4): 291-298 (in Chinese).
陈秀英, 赵小琴, 郑昌戈. 新型不对称五甲川菁染料的合成及光稳定性研究[J]. 影像科学与光化学. 2008, **26**(4): 291-298.
- [19] Karstens T, Kobs K. Rhodamine B and Rhodamine 101 as Reference Substances for Fluorescence Quantum Yield Measurements[J]. *J Phys Chem*, 1980, **84**(14): 1871-1872.

- [20] Velapoldi R A, Tønnesen H H. Corrected Emission Spectra and Quantum Yields for a Series of Fluorescent Compounds in the Visible Spectral Region[J]. *J Fluoresc*, 2004, **14**(4):465-472.
- [21] Mujumdar S R, Mujumdar R B, Grant C M, *et al.* Cyanine-labeling Reagents: Sulfobenzindocyanine Succinimidyl Esters [J]. *Bioconjugate Chem*, 1996, **7**(3):356-362.
- [22] WANG Wei, YAO Zuguang. Synthesis and Properties of Squarylium Cyanine Dyes Containing *N*-Alkyl Indole[J]. *Photogr Sci Photochem*, 1997, **15**(4):321-326 (in Chinese).
王伟, 姚祖光. 含 *N*-烷基吲哚环方酸菁染料的合成及性能[J]. *感光科学与光化学*, 1997, **15**(4):321-324.
- [23] SHEN Beifen, CHEN Zhinan, LIU Minpei. Recombinant Antibody [M]. Beijing: Science Press, 2005: 440-441 (in Chinese).
沈倍奋, 陈志南, 刘民培. 重组抗体[M]. 北京: 科学出版社. 2005: 440-441.

Novel Water-soluble Asymmetric Pentamethine Cyanine Dyes: Synthesis, Fluorescent Properties and Fluorescent Labeling

JIA Chunhui^{a,b}, QIU Na^a, WU Pin^c, WANG Sheng^b, TANG Kun^a, ZHANG Fuli^{a*}

(^aResearch Institute of Environmental Medicine, Medical College of Henan University, Kaifeng 475004, China;

^bPharmaceutical College of Henan University, Kaifeng 475004, China;

^cSecond Branch of Henan Jinkai Investment Holding Group, Kaifeng 475100, China)

Abstract Novel asymmetric pentamethine cyanine (Cy5) dye with a branched ether chain (polyethylene glycol) was synthesized. The structure of the product was identified by ¹H NMR and HRMS. The fluorescence properties and light stability of this Cy5 were investigated. Then albumin bovine serum (BSA) was labeled with this Cy5. The maximum absorption and emission wavelengths of the dye in water were 657 nm and 671 nm. The fluorescence quantum yield (Φ) was 0.24 in water. After irradiated for 8 h, the 4.4% of the aqueous soluble dye was photo-degraded. The dye-to-protein (D/P) value of fluorescent labeling reached 1.57 when the molar ratio of dye and BSA was 2:1.

Keywords indocyanine dyes, pentamethine, fluorescent labeling, branched compounds, albumin bovine serum, fluorescence quantum yield