

基于多重LRET效应的上转换发光探针构筑及pH检测

陈婷婷, 秦淑恒, 张玉明*

南通大学化学化工学院, 江苏 南通

收稿日期: 2023年1月8日; 录用日期: 2023年1月28日; 发布日期: 2023年2月10日

摘要

pH异常与多种疾病密切相关, 酸化是所有实体肿瘤的特征性标志之一。上转换发光材料具有多种独特优势, 适合生命体物种成像。有机小分子CouDa负载到上转换纳米颗粒(UCNPs)表面的疏水层组装成UCNPs@CouDa探针, 酸性/碱性条件下, 能量受体CouDa与供体UCNPs之间产生多重发光共振能量转移(LRET)效应, 且随pH变化的趋势相反。探针对溶液pH检测的灵敏度高, pKa约7.3, 线性响应范围在6.0~8.5, 不受生命体常见物种的干扰。与小分子探针CouDa相比, 该纳米探针响应速率快, 线性响应范围宽, 表明疏水环境有利于这一亲核加成反应机理的pH检测。

关键词

pH检测, 上转换发光探针, LRET

A Multiple LRET-Based Upconversion Luminescent Probe for Sensitive pH Detection

Tingting Chen, Shuheng Qin, Yuming Zhang*

School of Chemistry and Chemical Engineering, Nantong University, Nantong Jiangsu

Received: Jan. 8th, 2023; accepted: Jan. 28th, 2023; published: Feb. 10th, 2023

Abstract

pH dysregulation is closely relevant to many diseases, and acidosis is a hallmark of all solid tu-
*通讯作者。

文章引用: 陈婷婷, 秦淑恒, 张玉明. 基于多重 LRET 效应的上转换发光探针构筑及 pH 检测[J]. 分析化学进展, 2023, 13(1): 1-10. DOI: 10.12677/aac.2023.131001

mors. Upconversion luminescent particles (UCNPs) are suitable for bio-imaging due to their typical advantages. UCNPs@CouDa probe was constructed with CouDa in the hydrophobic layer on UCNPs surface. Multiple luminescence resonance energy transfer (LRET) processes occurred between CouDa and UCNPs that changed oppositely with pH variation. UCNPs@CouDa probe could image pH fluctuations with high sensitivity and good selectivity. Its pKa was nearly 7.3 and the linear detection range was between 6.0 to 8.5 which was broader than that of the small molecule probe CouDa. The nanoprobe responded to pH changes more quickly. All these indicated that the hydrophobic environment was favorable for the pH imaging, which is based on a nucleophilic reaction mechanism.

Keywords

pH Detection, Upconversion Luminescent Probe, LRET

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

pH 和细胞、组织的多种功能相关, 包括离子通道[1] [2]、内吞作用[3] [4] [5]、细胞增殖和凋亡[6]、肌肉收缩等[7] [8] [9]。pH 稳态是蛋白保持正常结构和功能, 实现生命体正常运转的关键[10]。肿瘤、阿尔兹海默症等多种疾病与 pH 异常密切相关。据报道, 不同的肿瘤组织, 其手术切除不完全的发生率在 25%~40%之间[11]。近年来, 临床上尝试用荧光探针特异性识别肿瘤细胞为手术导航, 提高手术治愈率。受肿瘤异质性等因素限制, 靶向特异性受体或酶的探针不具有普适性。酸化是所有实体肿瘤微环境的特征性标志之一[12] [13], 因此 pH 荧光探针具备识别各种肿瘤组织的可能。

上转换发光材料有反斯托克斯位移的特点, 近红外光激发, 可见光发射, 在生命体成像中具有独特的优势, 包括成像深度大、不受背景荧光干扰、半峰宽窄、发光稳定性好等[14] [15] [16]。同时, 肿瘤组织的高通透性和滞留效应有助于上转换纳米颗粒(UCNPs)在肿瘤中的聚集和成像[17] [18]。上转换材料本身不具备识别能力, 作为荧光供体与带有识别基团的荧光受体组装形成荧光探针, 发光共振能量转移(LRET)效应是构筑这类探针的常用策略。目前基于上转换发光材料开发的 pH 探针通常在一个波长下产生 LRET 效应[19] [20], 多个波长下的 LRET 过程有助于提高探针灵敏度, 这类探针鲜有报道。

前期开发的有机小分子荧光探针 CouDa 在酸性条件下 580 nm 处有强吸收, 碱性环境下探针与 OH⁻ 发生加成反应, 最大吸收峰蓝移到 430 nm, 能检测细胞及小鼠肿瘤中 pH 变化, 但响应时间较长, 灵敏度不高[21]。UCNPs (NaYF₄: 20% Yb, 2% Er)的发射峰与 CouDa 吸收峰位置吻合, 在 409 nm、542 nm 和 656 nm 三个波长下都可能产生 LRET 效应, 且随 pH 变化的趋势相反, 有助于提高检测灵敏度(图 1)。通过合理修饰, UCNPs 表面可以形成疏水层, 减弱水分子对 OH⁻ 的作用, 可能加速 CouDa 与 OH⁻ 的反应。据此, 我们在包裹了两亲聚合物 C₁₈PMH-mPEG 的 UCNPs (NaYF₄: 20% Yb, 2% Er)表面负载 CouDa, 得到 UCNPs@CouDa 探针。环境 pH 由酸性变成碱性时, 410 nm 处上转换发光(UCL_{410 nm})减弱, 同时 UCL_{542 nm} 和 UCL_{656 nm} 增强。在 pH 6.0~8.5 之间, 上转换发光比值 UCL_{542 nm}/UCL_{409 nm} 与 pH 的变化呈线性关系, pKa 值约 7.3, 对 pH 的响应选择性高, 适用于生命体相关的 pH 成像。

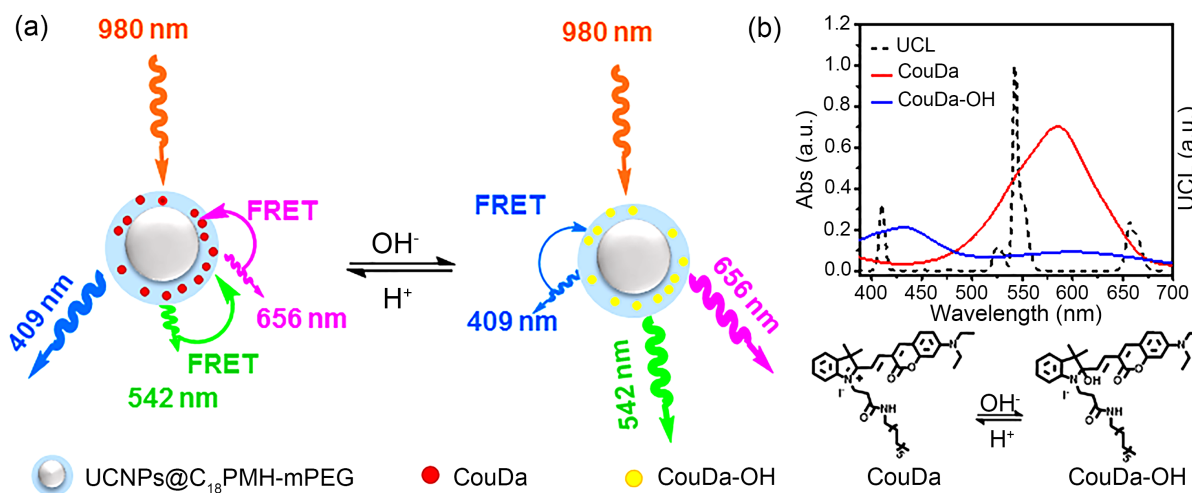


Figure 1. (a) Imaging illustration of UCNPs@CouDa toward pH fluctuations; (b) UCL spectra of UCNPs (NaYF₄: 20% Yb, 2% Er), absorption spectra of CouDa in acidic and basic environment, and the reaction mechanism of CouDa with OH⁻
图 1. (a) UCNPs@CouDa 对 pH 变化的响应示意图; (b) UCNPs (NaYF₄: 20% Yb, 2% Er) 发射光谱图, CouDa 在酸/碱性环境中吸收光谱图, 及 CouDa 对 pH 响应机理示意图

2. 实验部分

2.1. 仪器与试剂

Y₂O₃ (99.99%), Yb₂O₃ (99.99%), Er₂O₃ (99.99%), CF₃COOH (99.5%), 油胺 (>40%, GC) 购自梯希爱(上海)化成工业发展有限公司, mPEG-NH₂ (M_w = 5000 Da) 购自上海阿拉丁生化科技有限公司, C₁₈PMH-COOH (M_w = 30,000~500,00 Da) 购自 Aldrich 公司。合成所用试剂和溶剂都是国内供货商提供的分析纯等级, 使用时没有进一步提纯。实验用水为 Milli-Q 超纯水。上转换荧光光谱在北京卓立汉光 ZolixScan ZLX-UPL 光谱仪上测定(980 nm 激光光源), 其余荧光光谱在 Horiba FluoroMax-4 荧光光谱仪上测定。吸收光谱用 Perkin Elmer Lambda 35 紫外可见光谱仪测定。溶液 pH 用 PHS-3 精密 pH 计测定。X 射线衍射数据在 Simadzu XRD-6000 diffractometer 上采集, 透射电镜数据由 JEOL JEM-2100 收集。

2.2. 合成及表征

2.2.1. C₁₈PMH-mPEG 合成及表征

参照文献合成[22]。在含有 C₁₈PMH (40 mg, 1 eq.), mPEG-NH₂ (572 mg, 1 eq.), EDC·HCl (4 mg) 的烧瓶中加入 CH₂Cl₂ (20 mL) 和 Et₃N (24 μL), N₂ 保护下室温避光搅拌 24 h。停止反应, N₂ 吹干, 加入二次水搅拌溶解, 转移到半透膜中(M = 14 k), 透析 48 小时(期间多次换水), 冷冻干燥。经核磁表征, mPEG 对 C₁₈PMH 的修饰率为 100%。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 3.53-3.80 (m, br, CH₂ of mPEG), 1.28 (br, CH₂ of C₁₈PMH), 0.91 (br, CH₃ of C₁₈PMH)。

2.2.2. UCNPs 合成

UCNPs (NaYF₄: 20% Yb, 2% Er) 参照文献合成[23]。(CF₃COO)₃M (M = Y, Yb, Er) 由相应氧化物溶于 CF₃COOH 和水的混合溶液(1/1, v/v) 中制得。在 20 mL 油胺中分别加入 CF₃COONa (2 mmol, 285.60 mg), (CF₃COO)₃Y (0.78 mmol, 375.96 mg), (CF₃COO)₃Yb (0.20 mmol, 113.23 mg), (CF₃COO)₃Er (0.02 mmol, 11.21 mg), 搅拌溶解, 缓慢升温至 120℃, 抽真空 2 小时除去体系中的水和氧气后, 向体系内通入高纯氩气, 缓慢升温至 340℃ 并反应 2 小时。停止反应, 降至 60℃ 以下并加入 20 mL 乙醇, 10,000 r/min

离心，粒子用 1:1 的正己烷/乙醇混合溶液和水分别洗涤三次，分散于正己烷中待用。透射电镜和 X 射线衍射表征。

2.2.3. UCNPs@C18PMH-mPEG 合成

取上述 UCNPs，超声分散于氯仿中，加入 C₁₈PMH-mPEG (200 mg)，超声，搅拌过夜，室温下用 N₂ 吹干溶剂，加入纯水搅拌至分散，10,000 r/min 离心，强烈超声水洗至无泡沫，过膜除掉大颗粒(200 μm)，分散在水中 4℃ 保存。透射电镜表征。

2.2.4. UCNP@CouDa 合成

把 UCNPs@C₁₈PMH-mPEG (30 mg)分散在 pH 约 5.0 的 Na₂HPO₄-柠檬酸缓冲溶液中(5 mL)，滴加含 CouDa (15 mg)的 DMSO 溶液(0.5 mL)，避光剧烈搅拌过夜，离心，用含 10% 乙醇的上述酸性缓冲溶液超声洗涤，紫外 - 可见吸收光谱检测洗出液中没有 CouDa 为止。过膜滤掉大颗粒(200 μm)，分散在酸性缓冲液中 4℃ 保存。

2.2.5. CouDa 合成

按照文献合成[21]。

2.2.6. CouDa 负载量测定

按照文献方法[24]，称取一定量干燥的 UCNPs@C₁₈PMH-mPEG 颗粒，依次用一定量的 CH₃Cl、CH₃OH 多次分散超声洗涤，所得溶液定容，用紫外 - 可见光谱仪检测吸光度，并与标准工作曲线对照，计算负载量。

2.3. 光谱测试方法

实验中所用缓冲溶液均为 Na₂HPO₄-柠檬酸体系(0.2 M Na₂HPO₄, 0.1 M 柠檬酸)，用 NaOH 和 HCl 调节 pH 值。保存在酸性溶液中的 UCNPs@CouDa 粒子离心后用二次水洗，分散到缓冲溶液中，pH 计验证酸度。UCNPs@CouDa 溶液调整到目标 pH 值后，放置 30 分钟左右待光谱稳定后收集数据。上转换发光光谱采集完成后，立即进行紫外 - 可见吸收光谱测试。

择性测试中，UCNPs@CouDa 探针分散到 pH 7.4 的 Na₂HPO₄-柠檬酸缓冲溶液中，加入各竞争性物种，放置 30 分钟左右待光谱稳定后采集数据。对照组不加其他物种。

3. 结果与讨论

3.1. UCNPs@CouDa 的设计与表征

许多 pH 探针 pKa 值过于偏酸性，不适合用于生命体检测。CouDa 探针具有适合于生命体检测的 pKa 值(7.4)和线性响应范围(6.5~8.5)，但响应速率较慢[21]。基于 OH⁻与 CouDa 亲核加成反应的机理，我们推测在水溶液中 OH⁻与水分子相互作用阻碍了与 CouDa 的反应。当探针处于疏水环境中时，OH⁻受水分子影响减小，响应速率可能会加快。根据紫外 - 可见吸收光谱可知，碱性和酸性环境下，CouDa 的最大吸收峰分别位于 430 nm 和 580 nm 附近，UCNPs (NaYF₄: 20% Yb, 2% Er)的三个发射峰位于 409 nm、542 nm 和 660 nm，三个波长下的发射光都可能被 CouDa 吸收发生 LRET 过程，且环境 pH 变化时三个波长下的 LRET 效应变化趋势相反，有利于提高探针响应灵敏度。因此用含有疏水和亲水长链的两亲聚合物 C₁₈PMH-mPEG 包裹表面带有油胺的 UCNPs (UCNP@OM)，水溶液中粒子表面形成一个疏水层，带有 C₁₂烷基长链的 CouDa 通过疏水 - 疏水相互作用可自组装到这一疏水层中[24] [25]，加快与 OH⁻的响应。

由热分解法制得 UCNP@OM 颗粒,透射电镜及高分辨电镜显示粒径在 20~30 nm 左右,具有清晰的晶格条纹,晶格间距约 0.51 nm,与 β 态 UCNP(100)晶面的晶格间距相吻合(图 2(a), 图 2(b))。图 2(c)是制得的 UCNP@OM 粒子 X 射线衍射图(XRD)及报导的 β 态粒子标准卡(JCPDS File No. PDF 28-1192),对比发现晶体的衍射峰位置及强度与 β 态相吻合,同时也存在少量 α 态粒子(虚线标注)。C₁₈PMH-mPEG 包裹后,纳米颗粒形貌没有发生明显变化(图 2(d))。

CouDa 探针在 UCNP 上的负载量通过紫外-可见吸收光谱测定。CouDa 及 C₁₈PMH-mPEG 通过疏水-疏水相互作用自组装到 UCNP 表面,在可溶性有机溶剂中强烈超声时,它们会从颗粒表面脱落[24]。通过测量有机溶剂的吸光度并与标准工作曲线对照,测得每克 UCNP 表面负载的 CouDa 为 119 毫克,即负载率为 11.9%。

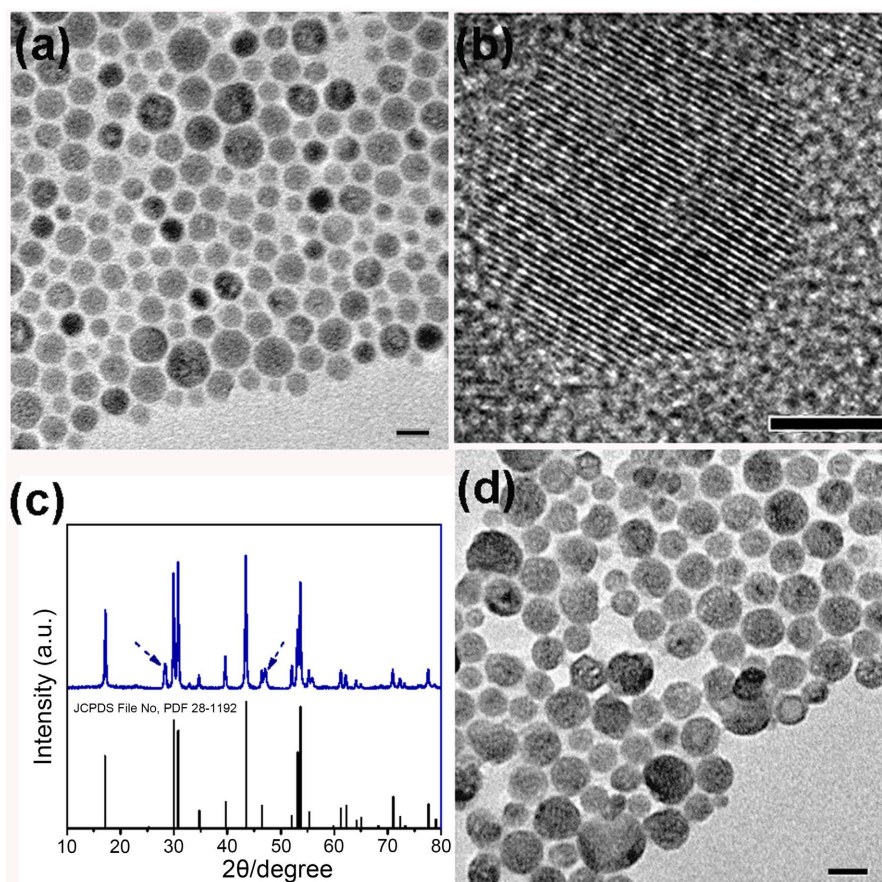


Figure 2. (a) TEM, (b) HR-TEM and (c) XRD spectra of UCNP@OM; (d) TEM of UCNP@C₁₈PMH-mPEG. Scale bar, 20 nm ((a), (b)), 5 nm (b)

图 2. UCNP@OM 粒子(a)透射电镜图, (b)高分辨透射电镜图, (c) XRD 图, 下图为 β 态粒子对照图, JCPDS File No. PDF 28-1192; (d) UCNP@C₁₈PMH-mPEG 粒子透射电镜图。标尺: 20 nm ((a), (b)), 5 nm (b)

3.2. UCNP@CouDa 光谱测试

首先测试了 UCNP@CouDa 对 pH 的响应速率。在 pH 7.4 的缓冲溶液中, 20 分钟左右探针的上转换发射及紫外-可见吸收光谱都达到了稳定状态, 说明探针与 OH⁻ 的反应达到平衡, 在 pH 8.4 的溶液中响应时间相近, 这一速率远大于小分子探针 CouDa 的响应速率(pH 8.4 时 40 min 左右) [21], 表明疏水环境有利于 CouDa 对 OH⁻ 的响应(图 3)。

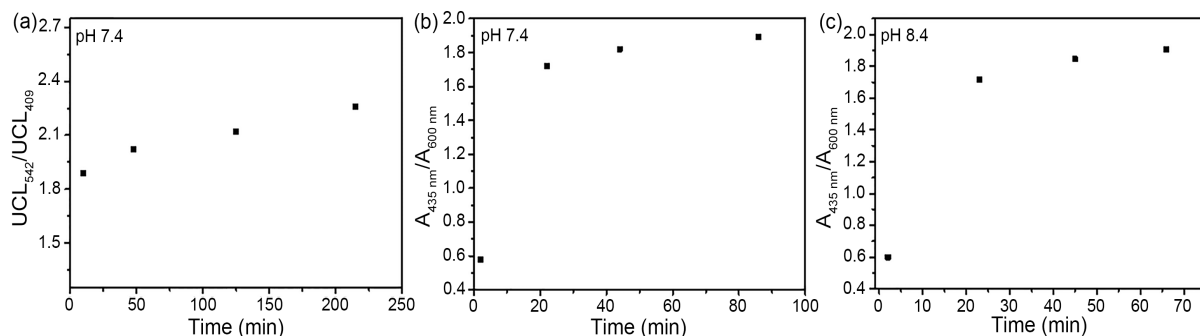
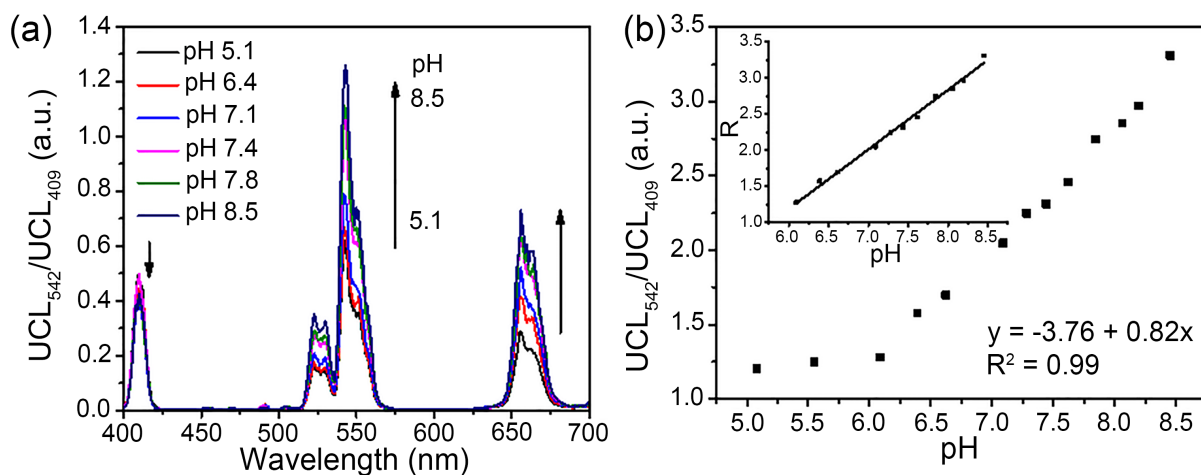


Figure 3. Time dependent upconversion luminescence spectra and absorption spectra of UCNPs@CouDa in Na_2HPO_4 -citric buffer solutions with pH 7.4 ((a), (b)) and pH 8.4 (c)

图 3. 在 pH 7.4 和 8.4 的 Na_2HPO_4 -柠檬酸缓冲溶液中 UCNPs@CouDa 的上转换发射光谱(a)及紫外-可见吸收光谱(b), (c)随时间变化图

生理 pH 条件下, UCNPs@CouDa 探针的上转换发射光谱如图 4(a)所示。pH 5.0 左右探针在 409 nm, 542 nm 及 656 nm 出现三组 UCNPs 的特征发射峰。当 pH 从 5.0 逐渐增大到 8.2 时, 409 nm 处上转换发射有所减弱, 而 542 nm 和 656 nm 处上转换发射都显著增强, 表明 UCNPs 三个波长下的发射光与 CouDa 之间都存在 LRET 过程。这与 CouDa 分子的吸收峰位置、强度随 pH 的变化相关。pH 5.0 附近, CouDa 在 500~700 nm 范围有一个强的宽吸收峰, 当 pH 增大到 8.0 以上时, 这一吸收峰减弱到几乎消失, 同时在 430 nm 附近出现一个新的较弱的吸收峰(图 4(c))。因此, 酸性环境中 UCNPs 在 542 nm 和 656 nm 的上转换发射光被 CouDa 吸收, LRET 效应较强, $\text{UCL}_{542 \text{ nm}}$ 和 $\text{UCL}_{656 \text{ nm}}$ 较弱。随 pH 增大 CouDa 对这两处光的吸收减弱, LRET 效应减弱, $\text{UCL}_{542 \text{ nm}}$ 和 $\text{UCL}_{656 \text{ nm}}$ 逐渐增强。而 409 nm 处的变化趋势恰好相反, 随 pH 增大, CouDa 对此处光的吸收逐渐增强, LRET 效应随之增大, 导致 $\text{UCL}_{409 \text{ nm}}$ 减弱。542 nm 和 409 nm 处发射峰比值($\text{UCL}_{542 \text{ nm}}/\text{UCL}_{409 \text{ nm}}$)对 pH 作图可以发现, 酸度小于 6.0 时该比值几乎保持不变, pH 6.0 到 8.5 范围内两者间存在显著的线性关系, $\text{UCL}_{542 \text{ nm}}/\text{UCL}_{409 \text{ nm}}$ 比值随 pH 增大而快速增大, 到 pH 8.5 时该比值增大约 2.8 倍(图 4(b))。小分子探针 CouDa 对 pH 的线性响应范围在 6.5~8.5 [21], 负载到 UCNPs 的疏水层后, 其线性响应范围拓宽, 表明疏水环境有利于 CouDa 对 pH 的响应。与小分子探针 CouDa 相比, UCNPs@CouDa 对 pH 的相应速率更快, 线性响应范围更宽, 对 pH 检测更加灵敏。通过 Henderson-Hasselbalch 方程[26]计算可得, UCNPs@CouDa 探针的 pKa 值约 7.3, 与小分子探针 CouDa 的 pKa 值一致(图 4(d))。



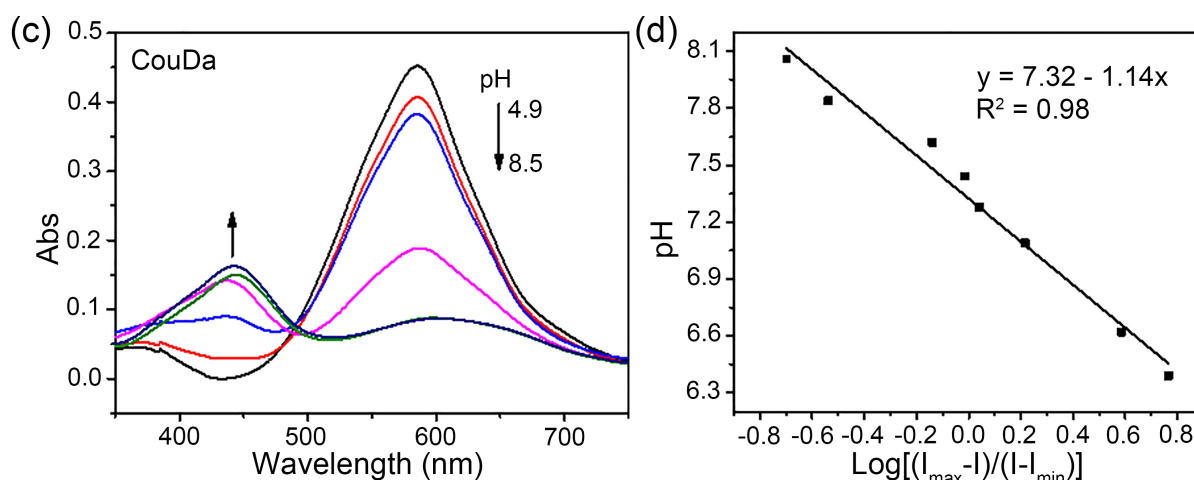


Figure 4. (a) Upconversion luminescence spectra of UCNPs@CouDa in Na_2HPO_4 -citric buffer solutions with pH 5.1 to 8.5; (b) Luminescence ratio ($\text{UCL}_{542 \text{ nm}}/\text{UCL}_{409 \text{ nm}}$) versus pH, and (b inset) the linear fitting between pH 6.0 to 8.5; (c) Absorption spectra of CouDa with pH 4.9 to 8.5; (d) Linear fitting of $\text{Log}[(I_{\text{max}}-I)/(I-I_{\text{min}})]$ versus pH, where I is the ratio of $\text{UCL}_{542 \text{ nm}}/\text{UCL}_{409 \text{ nm}}$; $\lambda_{\text{ex}} = 980 \text{ nm}$

图 4. (a) UCNPs@CouDa 在 pH 5.1 到 8.5 的 Na_2HPO_4 -柠檬酸缓冲溶液中的上转换发射光谱图; $\text{UCL}_{542 \text{ nm}}/\text{UCL}_{409 \text{ nm}}$ 比值随 pH 的变化图(b), 以及 pH 6.0~8.5 两者之间的线性关系拟合图(b 内插入图); (c) pH 4.9~8.5 小分子 CouDa 紫外 - 可见吸收光谱随 pH 变化图; (d) $\text{Log}[(I_{\text{max}}-I)/(I-I_{\text{min}})]$ 和 pH 之间的线性关系拟合图, I 为上转换发光比值 $\text{UCL}_{542 \text{ nm}}/\text{UCL}_{409 \text{ nm}}$; $\lambda_{\text{ex}} = 980 \text{ nm}$

上转换发光检测的同时收集了 UCNPs@CouDa 探针的紫外 - 可见吸收光谱随 pH 的变化(图 5)。pH 5.0 左右的酸性环境中, 上转换纳米探针在 450~700 nm 范围出现了宽而强的吸收峰, 半峰宽明显大于小分子探针 CouDa, 表明负载在 UCNPs 表面疏水层中的 CouDa 可能部分聚集。pH 逐渐增大时该吸收峰逐渐减弱, 同时在 440 nm 附近出现新的吸收峰。pH 小于 6.0 时 440 nm 和 543 nm 处的吸收强度比值变化很小($A_{440 \text{ nm}}/A_{543 \text{ nm}}$), 当 pH 大于 6.0 时, 该比值随 pH 增大而增大, pH 大于 7.8 时该比值不再变化, pH 6.0~7.8 范围内线性关系不明显。因此与小分子探针 CouDa 相比, 生理 pH 条件下 UCNPs@CouDa 的紫外 - 可见吸收光谱的灵敏度下降。

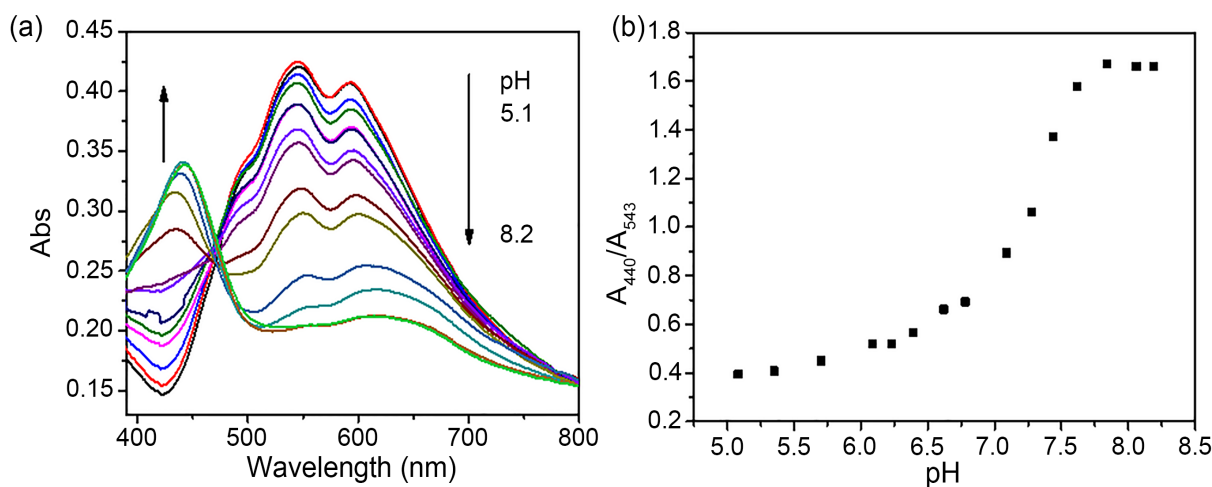


Figure 5. (a) Absorption spectra of UCNPs@CouDa in Na_2HPO_4 -citric buffer solutions with pH 5.0 to 8.2, (b) The absorption ratio ($A_{440 \text{ nm}}/A_{543 \text{ nm}}$) versus pH

图 5. UCNPs@CouDa 在 pH 5.0~8.2 的 Na_2HPO_4 -柠檬酸缓冲溶液中的紫外 - 可见吸收图(a), 409 nm 和 542 nm 处吸收比值($A_{440 \text{ nm}}/A_{543 \text{ nm}}$)随 pH 的变化图(b)

接着对 UCNP@CouDa 的选择性进行了测试。把上转换探针分散在 pH 7.4 的 Na_2HPO_4 -柠檬酸缓冲溶液中, 加入各生命体常见物种。如图 6 所示, 这些物种对探针的上转换发光影响很小, 对上转换发光强度比值 $\text{UCL}_{542\text{ nm}}/\text{UCL}_{409\text{ nm}}$ 的影响在 0.1 个单位以内。在 pH 线性响应范围 6.0 到 8.5 之间, 该比值变化约 2.8 倍。可见 UCNP@CouDa 对生理 pH 变化的响应具有高选择性。

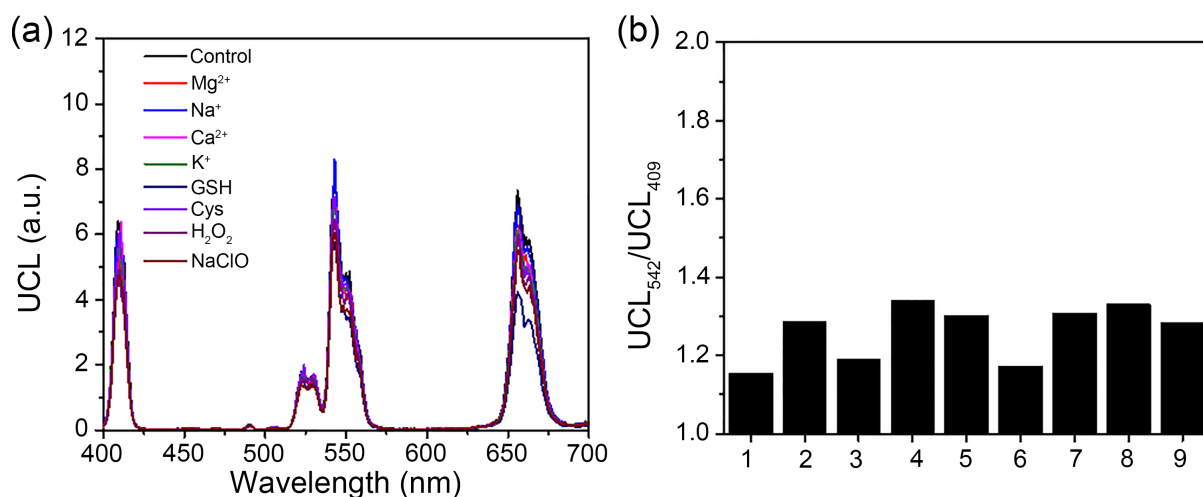


Figure 6. (a) Upconversion luminescence spectra of Na_2HPO_4 -citric buffer solution in pH 7.4 containing UCNP@CouDa and other biorelevant species. (b) Histograms of upconversion luminescence intensity ratio $\text{UCL}_{542\text{ nm}}/\text{UCL}_{409\text{ nm}}$ in diagram a. 1. Control, without competitive species; 2. Mg^{2+} ; 3. Na^+ ; 4. Ca^{2+} ; 5. K^+ ; 6. GSH; 7. Cys; 8. H_2O_2 ; 9. ClO^- (2~6, 10 mM; 6~7, 1 mM; 8~9, 200 μM). $\lambda_{\text{exc}} = 980\text{ nm}$

图 6. 含 UCNP@CouDa 的 pH 7.4 缓冲溶液中(Na_2HPO_4 -柠檬酸)加入各竞争性物种后的上转换发射图(a), 及各物种存在时溶液的上转换发射光强度比值($\text{UCL}_{542\text{ nm}}/\text{UCL}_{409\text{ nm}}$)。1、参照, 不含竞争性物种, 2、 Mg^{2+} , 3、 Na^+ , 4、 Ca^{2+} , 5、 K^+ , 6、GSH, 7、Cys, 8、 H_2O_2 , 9、 ClO^- (2~6, 10 Mm; 6~7, 1 mM; 8~9, 200 μM)。 $\lambda_{\text{ex}} = 980\text{ nm}$

4. 结论

有机小分子 CouDa 负载到 UCNP@ $\text{C}_{18}\text{PMH-mPEG}$ 疏水层, 组合成上转换探针 UCNP@CouDa。pH 变化时, 上转换颗粒的三组特征发射峰都可以被 CouDa 吸收, 产生三重 LRET 效应, 且 409 nm 处 LRET 变化趋势与 542 nm 及 656 nm 处相反, 使得 $\text{UCL}_{409\text{ nm}}$ 和 $\text{UCL}_{542\text{ nm}}$ 、 $\text{UCL}_{656\text{ nm}}$ 变化趋势相反, 单位 pH 范围内 $\text{UCL}_{542\text{ nm}}/\text{UCL}_{409\text{ nm}}$ 比值增大, 提高了检测灵敏度。UCNP@CouDa 探针的 pKa 值约 7.3, 对 pH 变化的线性响应范围在 6.0~8.5, 对 pH 检测具有高选择性。与小分子探针 CouDa 相比, 负载到疏水层的 CouDa 对 pH 响应更迅速, 线性响应范围更宽, 表明疏水环境有利于这一亲核加成机理的 pH 检测。

基金项目

感谢国家自然科学基金(22107054)、南通市基础科学基金(JC2021114)和江苏省大学生创新训练计划项目(202110304132H)的资助。

参考文献

- [1] Azoulay, I.S., Liu, F., Hu, Q., *et al.* (2020) ASIC1a Channels Regulate Mitochondrial Ion Signaling and Energy Homeostasis in Neurons. *Journal of Neurochemistry*, **153**, 203-215. <https://doi.org/10.1111/jnc.14971>
- [2] Cabrera-Garcia, D., Bekdash, R., Abbott, G.W., *et al.* (2021) The Envelope Protein of SARS-CoV-2 Increases Intra-Golgi pH and Forms a Cation Channel That Is Regulated by pH. *The Journal of Physiology*, **599**, 2851-2868. <https://doi.org/10.1113/JP281037>
- [3] Verdagner, M.P., Zhang, T., Paulo, J.A., *et al.* (2021) Mechanism of p38 MAPK-Induced EGFR Endocytosis and Its

- Crosstalk with Ligand-Induced Pathways. *Journal of Cell Biology*, **220**, e202102005. <https://doi.org/10.1083/jcb.202102005>
- [4] Richardson, D.S., Gregor, C., Winter, F.R., *et al.* (2017) SRpHi Ratiometric pH Biosensors for Super-Resolution Microscopy. *Nature Communications*, **8**, Article No. 577. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00606-4>
- [5] Leloup, N., Lössl, P., Meijer, D.H., *et al.* (2017) Low pH-Induced Conformational Change and Dimerization of Sortilin Triggers Endocytosed Ligand Release. *Nature Communications*, **8**, Article No. 1708. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01485-5>
- [6] Hu, Y., Lou, J., Jin, Z., *et al.* (2021) Advances in Research on the Regulatory Mechanism of NHE1 in Tumors. *Oncology Letters*, **21**, Article No. 273. <https://doi.org/10.3892/ol.2021.12534>
- [7] Chen, Y.R., Jiang, B.Y. and Chen, C.C. (2018) Acid-Sensing Ion Channels: Dual Function Proteins for Chemo-Sensing and Mechano-Sensing. *Journal of Biomedical Science*, **25**, Article No. 46. <https://doi.org/10.1186/s12929-018-0448-y>
- [8] Beg, A.A., Ernstrom, G.G., Nix, P., *et al.* (2008) Protons Act as a Transmitter for Muscle Contraction in *C. elegans*. *Cell*, **132**, 149-160. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.10.058>
- [9] Cooke, R., Franks, K., Luciani, G.B., *et al.* (1988) The Inhibition of Rabbit Skeletal Muscle Contraction by Hydrogen Ions and Phosphate. *The Journal of Physiology*, **395**, 77-97. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1988.sp016909>
- [10] Casey, J.R., Grinstein, S. and Orłowski, J. (2010) Sensors and Regulators of Intracellular pH. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **11**, 50-61. <https://doi.org/10.1038/nrm2820>
- [11] Siegel, R.L., Miller, K.D. and Jemal, A. (2017) Cancer Statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, **67**, 7-30. <https://doi.org/10.3322/caac.21387>
- [12] Corbet, C. and Feron, O. (2017) Tumour Acidosis: From the Passenger to the Driver's Seat. *Nature Reviews Cancer*, **17**, 577-593. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.77>
- [13] Chiche, J., Brahimi-Horn, M.C. and Pouyssegur, J. (2010) Tumour Hypoxia Induces a Metabolic Shift Causing Acidosis: A Common Feature in Cancer. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, **14**, 771-794. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2009.00994.x>
- [14] Su, Q., Feng, W., Yang, D., *et al.* (2017) Resonance Energy Transfer in Upconversion Nanoplatfoms for Selective Biodetection. *Accounts of Chemical Research*, **50**, 32-40. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.6b00382>
- [15] Di, X., Wang, D., Zhou, J., *et al.* (2021) Quantitatively Monitoring In Situ Mitochondrial Thermal Dynamics by Upconversion Nanoparticles. *Nano Letters*, **21**, 1651-1658. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.0c04281>
- [16] Gu, B. and Zhang, Q. (2018) Recent Advances on Functionalized Upconversion Nanoparticles for Detection of Small Molecules and Ions in Biosystems, *Advanced Science*, **5**, Article ID: 1700609. <https://doi.org/10.1002/advs.201700609>
- [17] Zhou, L., Wang, R., Yao, C., *et al.* (2015) Single-Band Upconversion Nanoprobes for Multiplexed Simultaneous *in Situ* Molecular Mapping of Cancer Biomarkers. *Nature Communications*, **6**, Article No. 6938. <https://doi.org/10.1038/ncomms7938>
- [18] Yang, Y., Huang, J., Wei, W., *et al.* (2022) Switching the NIR Upconversion of Nanoparticles for the Orthogonal Activation of Photoacoustic Imaging and Phototherapy. *Nature Communications*, **13**, Article No. 3149. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-30713-w>
- [19] Tsai, E.S., Joud, F., Wiesholler, L.M., *et al.* (2020) Upconversion Nanoparticles as Intracellular pH Messengers. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **412**, 6567-6581. <https://doi.org/10.1007/s00216-020-02768-5>
- [20] Wang, F., Raval, Y., Chen, H., *et al.* (2014) Development of Luminescent pH Sensor Films for Monitoring Bacterial Growth through Tissue. *Advanced Healthcare Materials*, **3**, 197-204. <https://doi.org/10.1002/adhm.201300101>
- [21] Zhang, Y., Chen, Y., Fang, H., *et al.* (2022) A Ratiometric pH Probe for Acidification Tracking in Dysfunctional Mitochondria and Tumour Tissue *In Vivo*. *Journal of Materials Chemistry B*, **10**, 5422-5429. <https://doi.org/10.1039/D2TB00553K>
- [22] Prencipe, G., Tabakman, S.M., Welscher, K., *et al.* (2009) PEG Branched Polymer for Functionalization of Nanomaterials with Ultralong Blood Circulation. *Journal of the American Chemical Society*, **131**, 4783-4787. <https://doi.org/10.1021/ja809086g>
- [23] Bogdan, N., Vetrone, F., Ozin, G.A., *et al.* (2011) Synthesis of Ligand-Free Colloidally Stable Water Dispersible Brightly Luminescent Lanthanide-Doped Upconverting Nanoparticles. *Nano Letters*, **11**, 835-840. <https://doi.org/10.1021/nl1041929>
- [24] Yao, L., Zhou, J., Liu, J., *et al.* (2012) Iridium-Complex-Modified Upconversion Nanophosphors for Effective LRET Detection of Cyanide Anions in Pure Water. *Advanced Functional Materials*, **22**, 2667-2672. <https://doi.org/10.1002/adfm.201102981>
- [25] Luo, Y., Zhang, W., Liao, Z., *et al.* (2018) Role of Mn²⁺ Doping in the Preparation of Core-Shell Structured

Fe₃O₄@upconversion Nanoparticles and Their Applications in T₁/T₂-Weighted Magnetic Resonance Imaging, Upconversion Luminescent Imaging and Near-Infrared Activated Photodynamic Therapy. *Nanomaterials*, **8**, Article No. 466. <https://doi.org/10.3390/nano8070466>

- [26] Silva, A.P., Gunaratne, H.Q.N. and Rice, T.E. (1996) Proton-Controlled Switching of Luminescence in Lanthanide Complexes in Aqueous Solution: pH Sensors Based on Long-Lived Emission. *Angewandte Chemie International Edition*, **35**, 2116-2118. <https://doi.org/10.1002/anie.199621161>