



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101892046 B

(45) 授权公告日 2013. 05. 08

(21) 申请号 201010209443. 3

C07D 293/10 (2006. 01)

(22) 申请日 2010. 06. 25

G01N 21/31 (2006. 01)

G01N 21/64 (2006. 01)

(73) 专利权人 北京理工大学

地址 100081 北京市海淀区中关村南大街 5 号

(56) 对比文件

WO 2010/028349 A2, 2010. 03. 11, 实施例 1-30.

(72) 发明人 张小玲 朱宝存

审查员 张晓默

(51) Int. Cl.

C09K 11/06 (2006. 01)

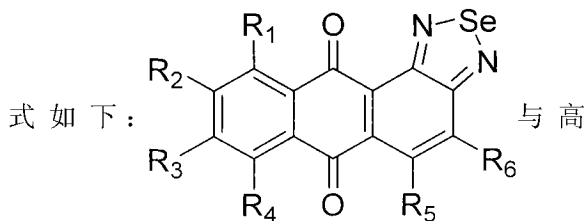
权利要求书1页 说明书4页 附图6页

(54) 发明名称

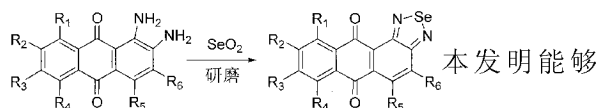
高选择性多元生物硫醇比色荧光探针及其制备方法

(57) 摘要

本发明涉及高选择性多元生物硫醇比色荧光探针及其制备方法,具体涉及一类以硒唑环为识别受体、以蒽醌衍生物为信息报告功能团,且能够高选择性地区分识别半胱氨酸、高半胱氨酸和谷胱甘肽的比色荧光探针及其制备方法,属于生命科学技术领域。其结构

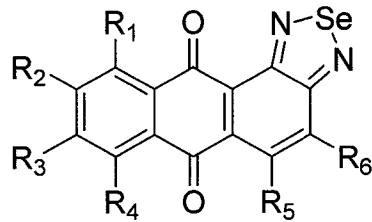


选择性多元生物硫醇比色荧光探针相应的二氨基化合物与二氧化硒在玛瑙研钵中进行研磨反应制得,研磨温度为 10 ~ 35 °C,研磨时间为 15 ~ 90min,相应的二氨基化合物与二氧化硒的摩尔比为 1 : 1 ~ 5,反应结构式为



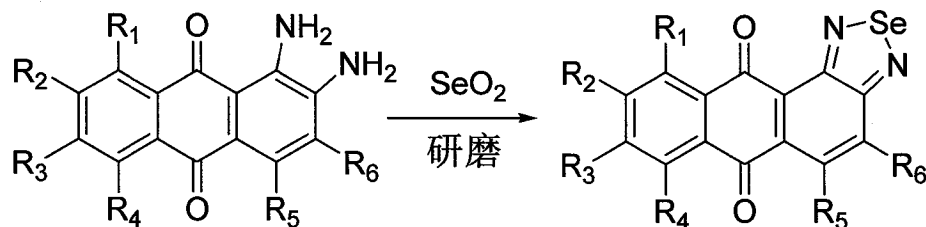
本发明能够用眼直接区分识别半胱氨酸、高半胱氨酸和谷胱甘肽,并能够在活细胞内对生物硫醇进行成像分析,该制备方法简单,环保,成本低,可工业化生产。

1. 高选择性多元生物硫醇比色荧光探针,其特征在于:以硒唑环为识别受体、以蒽醌衍生物作为信息报告功能团的多元生物硫醇比色荧光探针,其结构式如下:



式中:R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆ 为氢原子、烷基、烷氧基、磺酸基或酯基中的一种;R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆ 相同或不同。

2. 一种权利要求 1 所述的高选择性多元生物硫醇比色荧光探针的制备方法,其特征在于:与高选择性多元生物硫醇比色荧光探针相应的二氨基化合物与二氧化硒在玛瑙研钵中进行研磨反应制得,研磨温度为 10 ~ 35°C,研磨时间为 15 ~ 90min,相应的二氨基化合物与二氧化硒的摩尔比为 1 : 1 ~ 5;其反应结构式为:



上述方法得到的高选择性多元生物硫醇比色荧光探针分别与半胱氨酸、高半胱氨酸和谷胱甘肽进行作用可产生不同的吸收光谱同时伴随着不同的颜色变化和荧光发射光谱,从而实现对半胱氨酸、高半胱氨酸和谷胱甘肽的选择性识别;且与其他非硫醇氨基酸进行作用均不能导致吸收光谱和荧光发射光谱的明显改变,且这些氨基酸的存在对生物硫醇的定量测定没有干扰;与细胞孵育 10 ~ 60min 后就可导入细胞,从而实现对细胞内生物硫醇含量的测定。

高选择性多元生物硫醇比色荧光探针及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及高选择性多元生物硫醇比色荧光探针及其制备方法,具体涉及一类以硒唑环为识别受体、以葱醌衍生物为信息报告功能团,且能够高选择性地区分识别半胱氨酸、高半胱氨酸和谷胱甘肽的比色荧光探针及其制备方法,属于生命科学技术领域。

背景技术

[0002] 硫醇是生命体系和化学科学中一类非常重要的物质。小分子硫醇广泛分布在细胞、血浆和组织内,在参与重要生理活动和维持生物体内氧化还原平衡中起着极其重要的作用。谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 是细胞内存在的最丰富的小分子硫醇类化合物 (1 ~ 10mM),能与进入机体的有毒化合物、重金属离子或致癌物质等相结合,促其排出体外,因此起到中和解毒作用。另外,谷胱甘肽是保护酶和其他蛋白质的巯基的一种抗氧化剂,是细胞内非蛋白巯基的主要组成部分,参与细胞内的氧化还原反应,还原型 (GSH) 与氧化型谷胱甘肽 (GSSG) 含量的比值在维持体内氧化还原平衡中起着关键作用,这个比值的异常变化将导致心脏病、肿瘤和多种精神紊乱等疾病的发生。半胱氨酸 (cysteine, Cys) 和高半胱氨酸 (也称作同型半胱氨酸, homocysteine, Hcy) 也是生物体内存在的两个重要的硫醇类化合物。半胱氨酸含量的降低常会引起发育缓慢、头发退色、水肿、精神萎靡、肝脏疾病、皮肤损伤及瘦弱等疾病。高半胱氨酸在血浆中浓度的升高将会伴随着心肌梗塞、抽风、静脉血栓堵塞等疾病。高半胱氨酸的含量高于正常值还可能会引起老年痴呆症 (Alzheimer's disease), 神经中枢缺陷,怀孕并发症,肠炎和骨质疏松等疾病。此外,血样中氧化态 Cys 和 Hcy 等浓度的升高,或者还原型 GSH 浓度的降低都是氧化应激特征性的表征指标。由于含硫醇氨基酸能很好的反映细胞氧化应激的程度,因此血样中硫醇类氨基酸的浓度变化已开始用作于诊断和检测各种代谢紊乱疾病的临床指标。

[0003] 鉴于此,已发展了多种分析方法用于生物硫醇的检测,尤其是比色和荧光光谱法得到了充分发展并取得了较大的进步,但仅局限在:提高探针的灵敏度和选择性、缩短响应时间以能够实现实时检测以及增宽测量范围以满足实际应用中的要求等。最近, de Silva 等人在 Nature 上详细阐述了多元分析探针的优越性,其中最主要的一点是它能够克服分析多种目标物需要同时注入多种探针带来的不足。多元探针虽有一定的发展,但几乎全部用于分析氢离子和金属阳离子,而能够有效地区分识别这些生物硫醇的探针依然未见报道。因此,设计合成一类能够区分识别多种生物硫醇的多元探针成为本发明要解决的主要目标。

发明内容

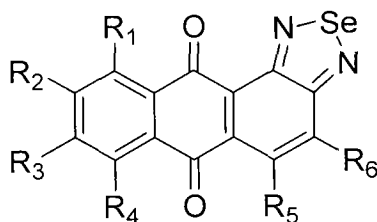
[0004] 本发明的目的是为了解决现有技术不能区分识别半胱氨酸、高半胱氨酸和谷胱甘肽在活体细胞内含量的问题,提出高选择性多元生物硫醇比色荧光探针及其制备方法。

[0005] 本发明的目的是通过以下技术方案实现的。

[0006] 本发明的高选择性多元生物硫醇比色荧光探针,一类以硒唑环为识别受体、以葱

醌衍生物作为信息报告功能团的多元生物硫醇比色荧光探针,其结构式如下:

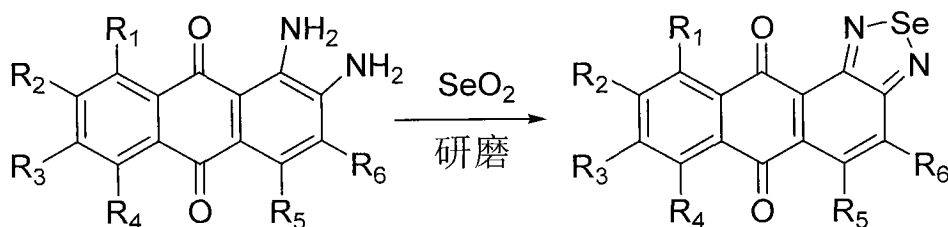
[0007]



[0008] 式中: $R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6$ 为氢原子、烷基、烷氧基、磺酸基或酯基中的一种; $R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6$ 可以相同或不同。

[0009] 本发明的高选择性多元生物硫醇比色荧光探针的制备方法为:与高选择性多元生物硫醇比色荧光探针相应的二氨基化合物与二氧化硒在玛瑙研钵中进行研磨反应制得,研磨温度为 $10 \sim 35^\circ\text{C}$,研磨时间为 $15 \sim 90\text{min}$,相应的二氨基化合物与二氧化硒的摩尔比为 $1 : 1 \sim 5$;其反应结构式为:

[0010]



[0011] 上述方法得到的高选择性多元生物硫醇比色荧光探针分别与半胱氨酸、高半胱氨酸和谷胱甘肽进行作用可产生不同的吸收光谱同时伴随着不同的颜色变化和荧光发射光谱,从而实现对半胱氨酸、高半胱氨酸和谷胱甘肽的选择性识别;且与其他非硫醇氨基酸进行作用均不能导致吸收光谱和荧光发射光谱的明显改变,且这些氨基酸的存在对生物硫醇的定量测定没有干扰;与细胞孵育 $10 \sim 60\text{min}$ 后就可导入细胞,从而实现对细胞内生物硫醇含量的测定。

[0012] 设计思路:蒽醌和它的衍生物常作为发色团和荧光团被广泛应用在阴离子和金属离子探针的设计中,且这些探针在识别目标物的过程中常伴随着溶液颜色和荧光光谱的变化。另外,已报道的结论和我们取得的研究结果表明硒唑环可以作为高选择性识别硫醇的受体。在此基础上,我们设计合成了以二氨基蒽醌衍生物作为信息报告功能团和有机硒唑环作为受体的硫醇探针。我们猜测二氨基蒽醌衍生物中的二胺一旦形成硒唑环形式,吸收光谱会有较大程度地蓝移。当向探针溶液中加入生物硫醇后,硒唑的肢解将导致吸收光谱的红移。重要的是,生物硫醇中的其他官能团(如氨基、羧基等)可能会与蒽醌中的羰基发生不同形式或程度的作用,从而导致不同程度的红移吸收光谱和荧光光谱的出现,进而将它们区分开。

[0013] 有益效果

[0014] 本发明能够用眼直接区分识别半胱氨酸、高半胱氨酸和谷胱甘肽,并能够在活细胞内对生物硫醇进行成像分析,该制备方法简单,环保,成本低,可工业化生产。

附图说明

- [0015] 图 1 是不同分析物对目标物 (10 μ M) 吸收光谱的影响 ;
- [0016] 图 2 是不同分析物对目标物 (10 μ M) 荧光光谱的影响 ;
- [0017] 图 3 是不同分析物存在下目标物溶液颜色的变化 ;
- [0018] 图 4 是不同浓度 (0 ~ 900 μ M) 的 GSH 对目标物 (10 μ M) 吸收光谱的影响 ;
- [0019] 图 5 是不同浓度 (0 ~ 900 μ M) 的 GSH 对目标物 (10 μ M) 吸收光谱的影响 ;
- [0020] 图 6 是不同浓度 (20 ~ 120 μ M) 的 GSH 对目标物 (10 μ M) 吸收光谱的影响 ;
- [0021] 图 7 是不同浓度 (0 ~ 900 μ M) 的 GSH 对目标物 (10 μ M) 荧光光谱的影响 ;
- [0022] 图 8 是不同浓度 (0 ~ 900 μ M) 的 GSH 对目标物 (10 μ M) 荧光光谱的影响 ;
- [0023] 图 9 是不同浓度 (0 ~ 100 μ M) 的 GSH 对目标物 (10 μ M) 荧光光谱的影响 ;
- [0024] 图 10 是不同分析物对目标物 (10 μ M) 吸收光谱法定量分析 GSH (300 μ M) 结果的影响 ;
- [0025] 图 11 是不同分析物对目标物 (10 μ M) 荧光光谱法定量分析 GSH (300 μ M) 结果的影响 ;
- [0026] 图 12 是目标物标记活体 HeLa 细胞的共聚焦成像图 ;
- [0027] 图 13 是目标物标记经 NEM 处理过的活体 HeLa 细胞的共聚焦成像图。

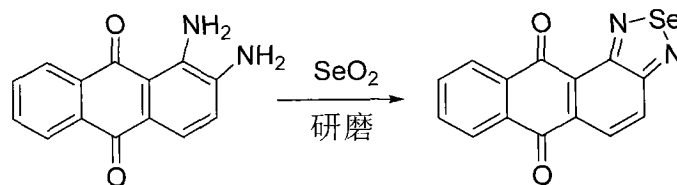
具体实施方式

[0028] 下面结合实施例对本发明做进一步说明。

[0029] 实施例

[0030] 将 238.2mg (1mmol) 1,2-二胺基蒽醌和 221.9mg (2mmol) 二氧化硒分别在玛瑙研钵里研细,然后将研细后的两种化合物混合,继续研磨 1h,然后将研磨后的混合物溶于三氯甲烷中,过滤,减压下蒸去溶剂,残余物经柱色谱分离,三氯甲烷做淋洗剂,然后将淋洗液除去三氯甲烷淋洗剂,得目标物纯品 261.8mg,收率 84%,反应式如下 :

[0031]



[0032] 得到的目标物的核磁氢谱和高分辨质谱表征数据如下 :

[0033] $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO-d_6) δ ($\times 10^{-6}$) : 7.95 (t, $J = 7.0\text{Hz}$, 2H), 8.20 (d, $J = 7.6\text{Hz}$, 2H), 8.34 (d, $J = 2.8\text{Hz}$, 2H) ;

[0034] HRMS (ESI positive) : $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_7\text{N}_2\text{O}_2\text{Se}$ 314.96676, found 314.96644.

[0035] 将得到的目标物对被分析物进行识别分析,被分析物为半胱氨酸 Cys、高半胱氨酸 Hcy、谷胱甘肽 GSH、精氨酸 Arg、丙氨酸 Ala、酪氨酸 Tyr、赖氨酸 Lys、组氨酸 His、天冬氨酸 Asp、缬氨酸 Val、亮氨酸 Leu、色氨酸 Try、甲硫氨酸 Met、脯氨酸 Pro、苯丙氨酸 Phep、丝氨酸 Ser、苏氨酸 Thr、谷氨酸 Glu 和甘氨酸 Gly,被分析物的浓度均为 300 μ M,其具体识别分析步骤为 :

[0036] 在 25 $^{\circ}\text{C}$ 下,将 10 μ M 的目标物和被分析物溶于磷酸盐缓冲溶液和乙醇的混合体系中,混合 1h 后测试紫外光谱和荧光光谱并同时观察其颜色变化 ;所加入的磷酸盐缓冲溶液

为 20mM, 其 pH 为 7.4, 乙醇与水的体积比为 1 : 1 ; 所用的激发波长是 490nm, 激发和发射狭缝宽度都是 5nm, 测试得到的紫外光谱谱图如图 1 所示, 测试得到的荧光光谱谱图如图 2 所示, 其颜色变化如图 3 所示, 其图中 1 代表目标物和 Cys, 2 代表目标物和 Hcy, 3 代表目标物和 GSH, 4 代表目标物, 5 代表目标物和其他自然氨基酸的混合物 ;

[0037] 将得到的目标物对 GSH 进行定量分析, 其具体步骤为 :

[0038] 在 25℃ 下, 将 10 μ M 的目标物以及目标物与浓度分别为 10 μ M、20 μ M、30 μ M、40 μ M、50 μ M、60 μ M、70 μ M、80 μ M、90 μ M、100 μ M、120 μ M、140 μ M、160 μ M、200 μ M、300 μ M、400 μ M、500 μ M、600 μ M、700 μ M、800 μ M、900 μ M 的 GSH 溶于磷酸盐缓冲溶液和乙醇的混合体系中, 混合 1h 后测试紫外光谱和荧光光谱 ; 所加入的磷酸盐缓冲溶液为 20mM, 其 pH 为 7.4, 乙醇与水的体积比为 1 : 1 ; 所用的激发波长是 490nm, 激发和发射狭缝宽度都是 5nm, 测试得到的紫外光谱谱图如图 4 和图 5 所示, 目标物 490nm 处的吸光度与 GSH 浓度的线性关系如图 6 所示 ; 测试得到的荧光光谱谱图如图 7 和图 8 所示, 目标物 594nm 处的荧光强度与 GSH 浓度的线性关系如图 9 所示 ;

[0039] 不同干扰物对目标物定量测试 GSH 的影响, 其具体步骤为 :

[0040] 在 25℃ 下, 将 10 μ M 目标物、300 μ M GSH 和 300 μ M 干扰物溶于磷酸盐缓冲溶液和乙醇的混合体系中, 混合 1h 后测试紫外光谱和荧光光谱 ; 所加入的磷酸盐缓冲溶液为 20mM, 其 pH 为 7.4, 乙醇与水的体积比为 1 : 1 ; 所用的激发波长是 490nm, 激发和发射狭缝宽度都是 5nm ; 干扰物分别为 Arg、Ala、Tyr、Lys、His、Asp、Val、Leu、Try、Met、Pro、Phe、Ser、Thr、Glu 和 Gly, 测试得到的紫外光谱谱图如图 10 所示, 图中柱状图为在 490nm 处的吸光度 ; 测试得到的荧光光谱谱图如图 11 所示, 图中柱状图为在 594nm 处的荧光强度 ; 图 10 和图 11 中柱状图分别代表目标物 (1)、目标物 +GSH+Arg (2)、目标物 +GSH+Ala (3)、目标物 +GSH+Tyr (4)、目标物 +GSH+Lys (5)、目标物 +GSH+His (6)、目标物 +GSH+Asp (7)、目标物 +GSH+Val (8)、目标物 +GSH+Leu (9)、目标物 +GSH+Try (10)、目标物 +GSH+Met (11)、目标物 +GSH+Pro (12)、目标物 +GSH+Phe (13)、目标物 +GSH+Ser (14)、目标物 +GSH+Thr (15)、目标物 +GSH+Glu (16)、目标物 +GSH+Gly (17) 和目标物 +GSH (18)。

[0041] 细胞成像实验 :

[0042] 为了考察目标物测定活体细胞内生物硫醇的能力, 我们将目标物应用到活体 HeLa 细胞的成像分析实验 ; 经目标物 (10 μ M) 孵育 30min 后, HeLa 细胞的细胞质内呈现强的红色荧光如图 12 所示, 这一结果表明目标物能够穿透细胞膜并能够靶向性地标记细胞质 ; 此外, 我们先用 50 μ M NEM 对细胞进行预处理以降低细胞内生物硫醇的浓度, 然后再用目标物 (10 μ M) 孵育 30min, 结果表明红色荧光明显降低如图 13 所示 ; 这些结果表明目标物的荧光变化的确是由细胞内生物硫醇含量的改变导致的, 具体步骤为 :

[0043] HeLa 细胞 (北京协和医科大学细胞中心) 用 DMEM/F12 培养液 (含 10% 胎牛血清, 50U/mL 青霉素, 50 μ g/mL 链霉素) 调整细胞密度为 10^6 个细胞 /mL, 置于无菌的培养皿中, 37℃ 5% 二氧化碳培养箱中进行培养 ; 先用无血清的 DMEM 清洗 3 次, 除去未贴壁的细胞, 然后再用培养液稀释分别置于两个 6 孔板中进行培养供实验所用 ; 一部分直接用 10 μ M 目标物溶液孵育 30min ; 一部分先用 50 μ M NEM 孵育 2h 以降低细胞内生物硫醇的浓度, 然后再用 10 μ M 目标物溶液孵育 30min。用激光共聚焦显微镜拍摄上述细胞的荧光显微照片, 激发光源 : 绿光 ; 激光共聚焦显微成像前, 除去培养液, 然后再用 PBS 缓冲溶液冲洗两次。

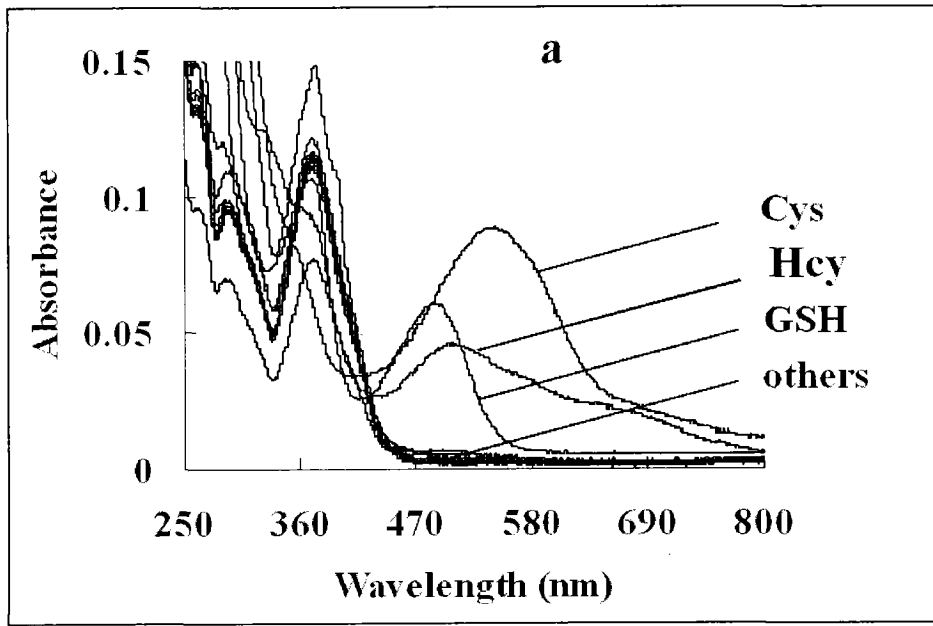


图 1

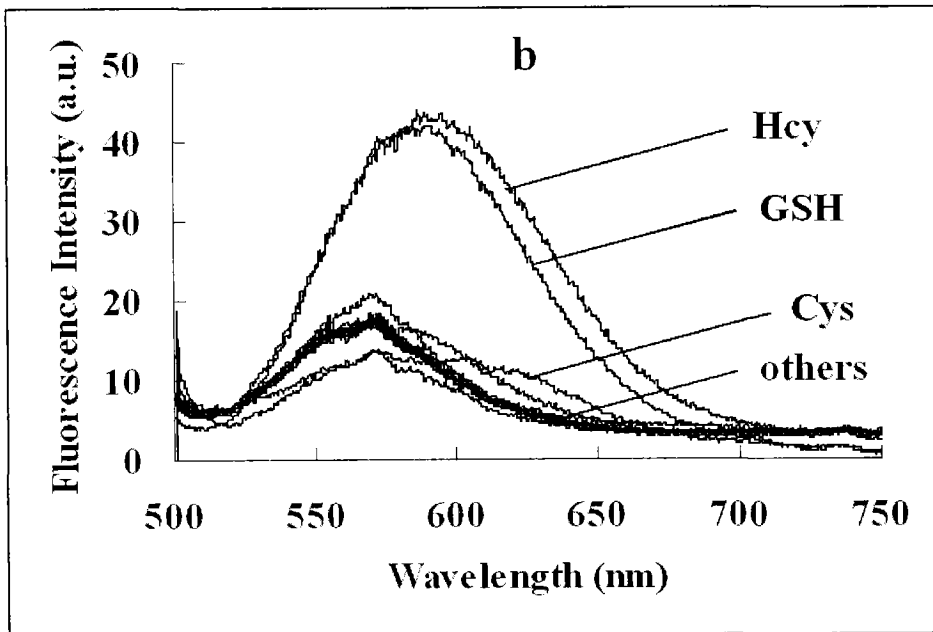


图 2

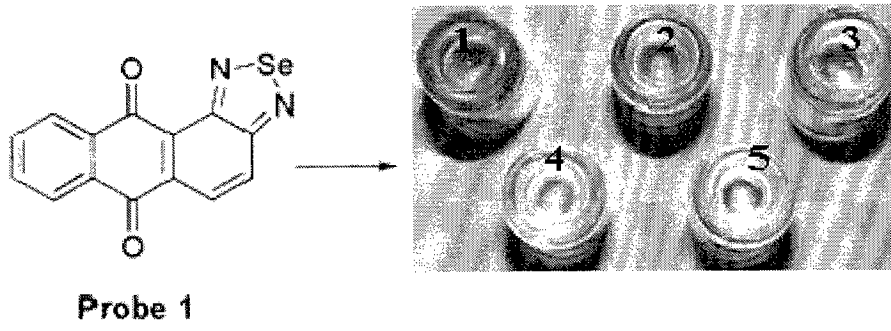


图 3

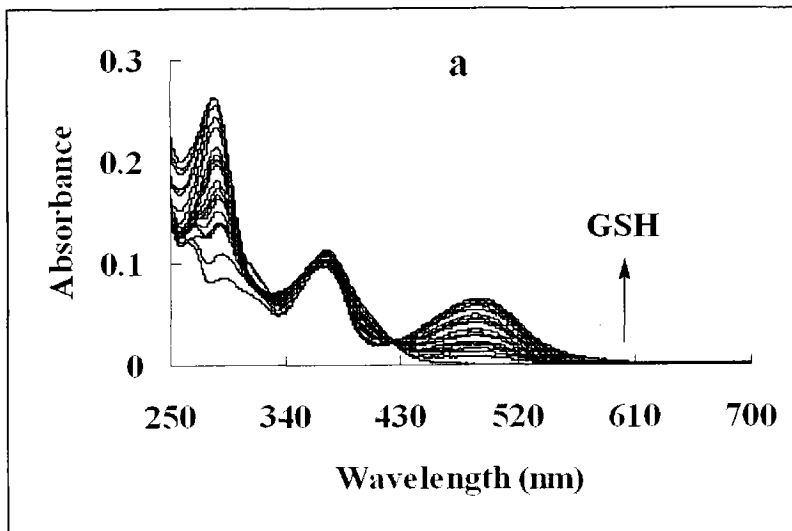


图 4

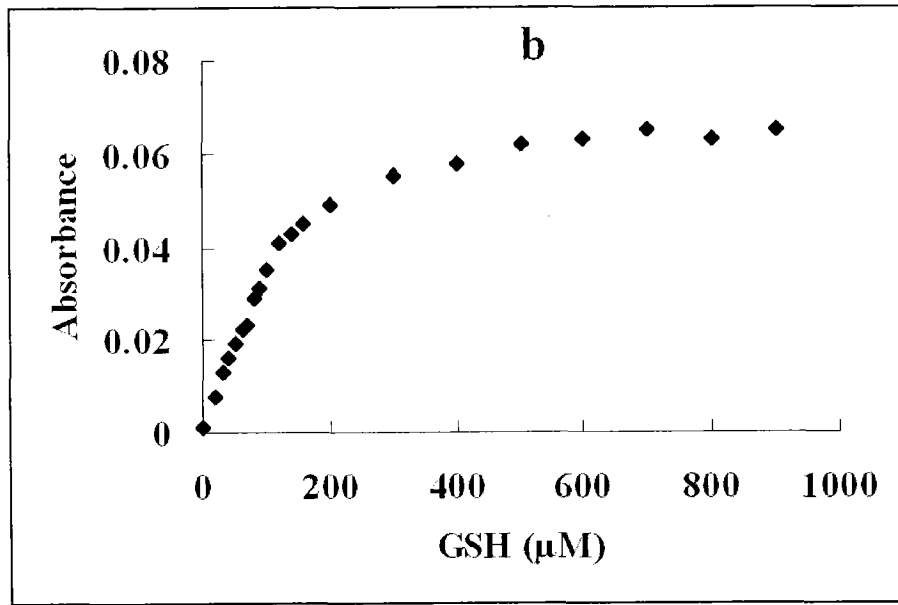


图 5

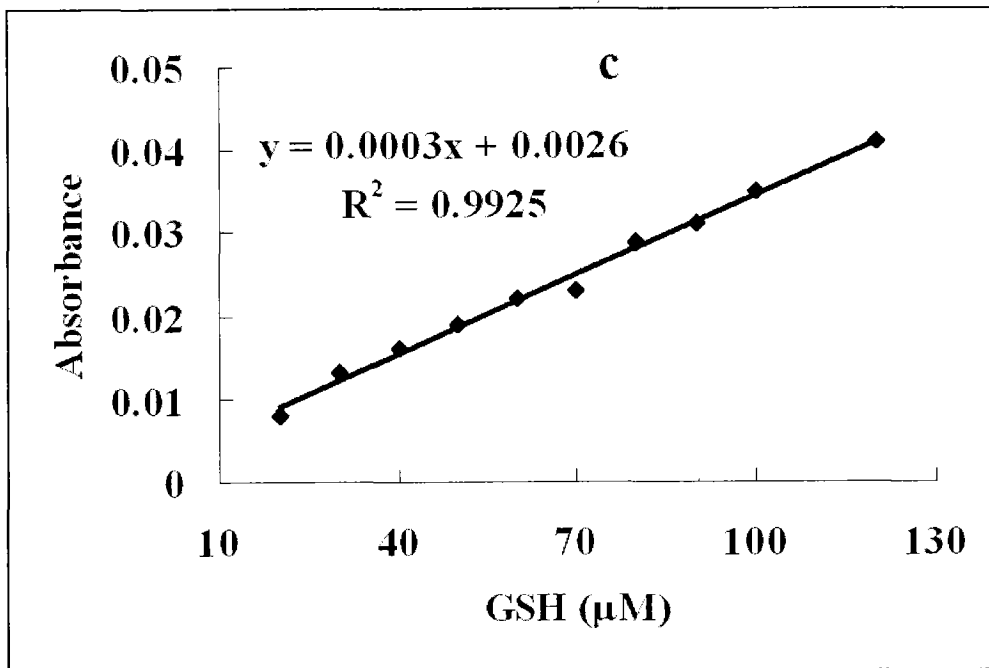


图 6

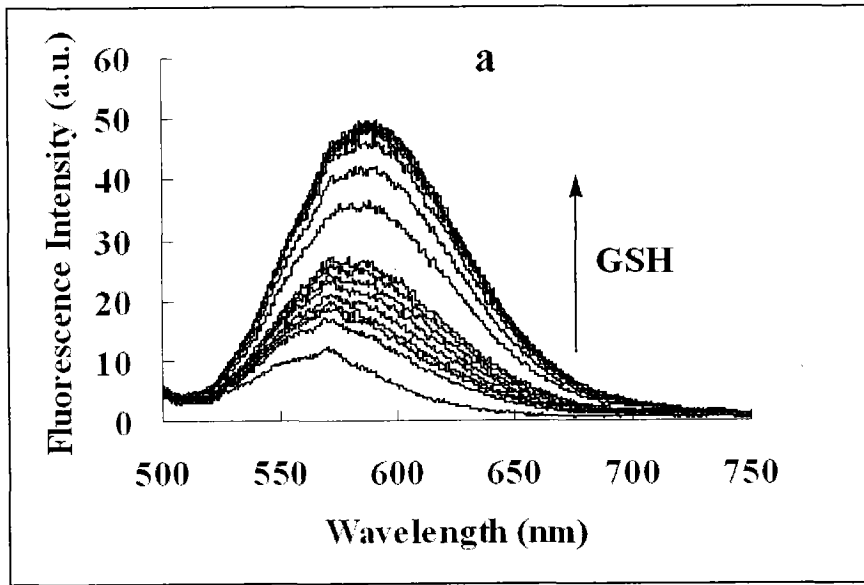


图 7

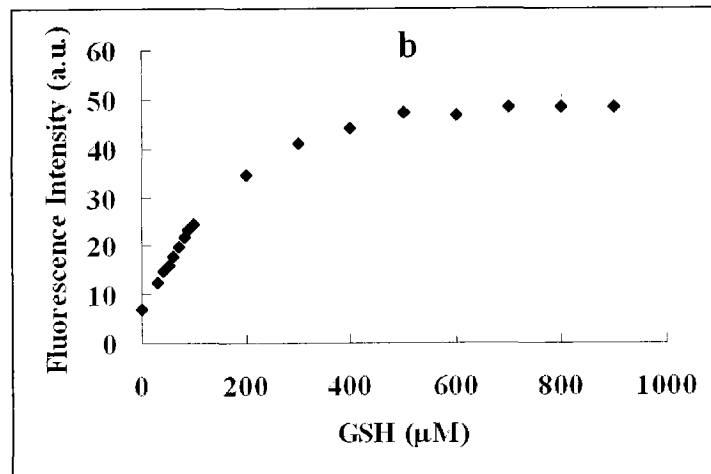


图 8

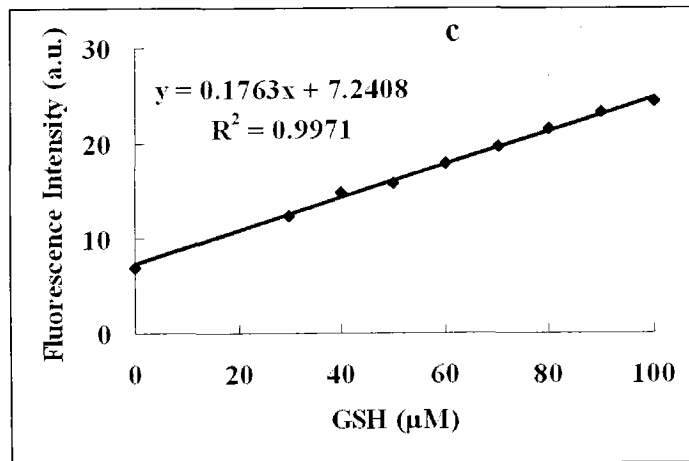


图 9

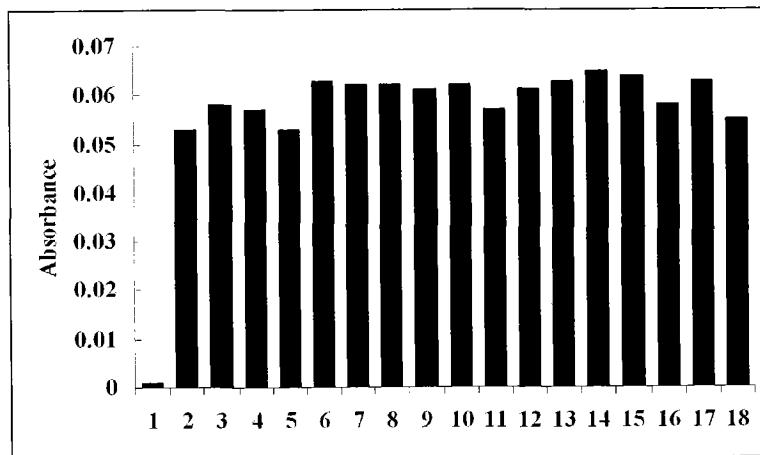


图 10

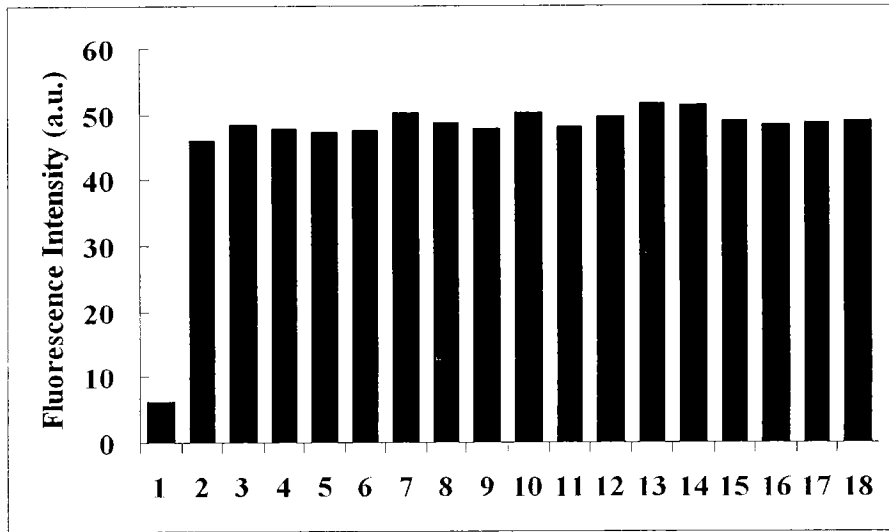


图 11

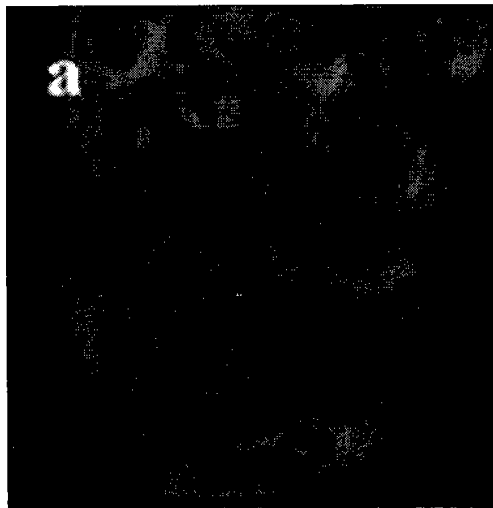


图 12

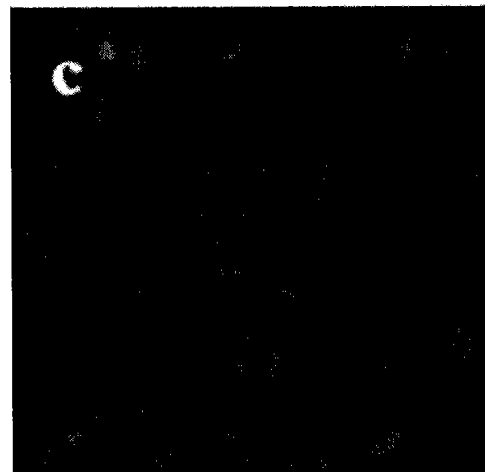


图 13