



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103102338 B

(45) 授权公告日 2015. 02. 18

(21) 申请号 201210586667. 5

(22) 申请日 2012. 12. 28

(73) 专利权人 深圳先进技术研究院

地址 518055 广东省深圳市南山区西丽大学城学苑大道 1068 号

(72) 发明人 蔡林涛 龚萍 杨月婷 石碧华 王碧 张鹏飞 郑明彬 胡德红 盛宗海 刘朋 高笃阳 郑翠芳

(74) 专利代理机构 深圳市科进知识产权代理事务所 (普通合伙) 44316

代理人 宋鹰武

(51) Int. Cl.

C07D 311/82 (2006. 01)

C09K 11/06 (2006. 01)

G01N 21/64 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101921587 A, 2010. 12. 22, 摘要.

CN 102086206 A, 2011. 06. 08, 说明书第 1-2 页.

Xiaowei Cao et al.. A Ratiometric

Fluorescent Probe for Thiols Based on a Tetrakis(4-hydroxyphenyl) porphyrin-Coumarin Scaffold. 《The Journal of Organic Chemistry》. 2011, 第 76 卷第 7423-7430 页.

Phani Kumar Pullela et al..

Fluorescence-based detection of thiols in vitro and in vivo using dithiol probes. 《Analytical Biochemistry》. 2006, 第 352 卷第 265-273 页.

审查员 李磊

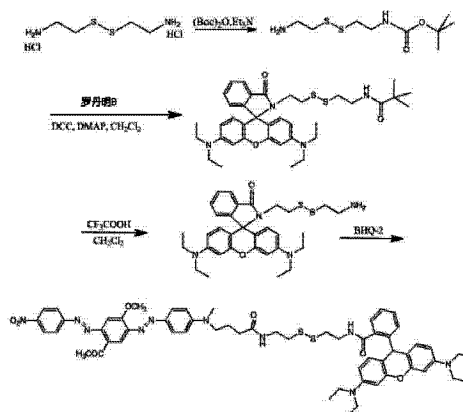
权利要求书1页 说明书6页 附图3页

(54) 发明名称

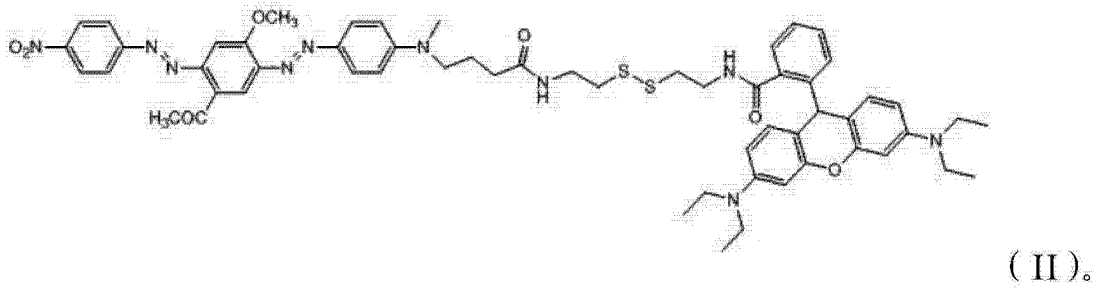
生物巯基荧光探针、其制备方法及应用

(57) 摘要

本发明公开了一种生物巯基荧光探针,所述探针采用第一荧光基团做发射荧光的能量供体,第二荧光基团或淬灭基团做吸收荧光的能量受体,所述探针结构为 R-S-S-R',其中,R 含有第一荧光基团,R' 含有第二荧光基团或淬灭基团。本发明还提供了所述生物巯基荧光探针的制备方法和应用。本发明利用生物巯基探针自身荧光强度衰减或淬灭,提高了成像信噪比,同时,与巯基反应后的荧光稳定性高;本发明的荧光探针的制备方法简单,可在常温、常压、中性 pH 条件下进行。



1. 一种生物巯基荧光探针,其特征在于,其结构如式 II:



2. 用于检测生物巯基的试剂盒,包括:  
权利要求 1 所述的生物巯基荧光探针;和  
用于洗涤细胞或组织的缓冲液。
3. 权利要求 1 所述的生物巯基荧光探针在生物巯基检测或化学体系巯基检测中的应用。

## 生物巯基荧光探针、其制备方法及应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物检测技术领域,具体涉及一种生物巯基荧光探针及其制备以及在活性细胞或生物活体巯基含量测定中的应用。

### 背景技术

[0002] 巯基(-SH)是细胞中化学活性最高的基团。在蛋白质中,巯基部分是与酶活性有关的最具反应性的官能团,两个巯基脱氢形成二硫键(-S-S-),使相邻多肽得以连接,对于维持蛋白质完整结构十分重要。细胞中的巯基,尤其是谷胱甘肽(GSH)作为细胞内的亲核试剂和还原试剂,能保护细胞不受缺氧、毒素、诱变、放射性及致癌物的侵害。大量的生物现象均依赖于包括巯基在内的硫醇类物质,如氧化还原反应、甲基转移反应、二氧化碳固定反应及辅酶A参与的反应等。游离的小分子巯基物质包括半胱氨酸(Cys)、高半胱氨酸(Hcy)、还原型谷胱甘肽(GSH)、二氢硫辛酸和辅酶A等。体内巯基分子的含量直接与多种疾病相关,如癌症、帕金森综合症、心血管疾病等,Cys缺乏和儿童生长缓慢、浮肿、嗜睡和肝脏损伤等病症相关,而血浆Hcy浓度升高则是动脉粥样硬化一个独立的风险因子。因此,发展快速、灵敏、简便的检测巯基的方法在生物化学和临床化学中均具有重要意义。传统的巯基检测方法有质谱法、高效液相色谱法(HPLC)、电化学法、分光光度法、比色法等,这些方法操作繁琐,灵敏度低,且不适合生物样本中巯基的检测。

[0003] 荧光测定法有成本低、可重复性好、灵敏度高、选择性强、可视化等优点,近年来成为研究焦点,取得了较大的进展。巯基荧光探针出了检测灵敏,还可作为生物结构研究指示系统,被广泛应用于研究蛋白结构和微环境性质、微量检测胆碱或谷胱甘肽S转移酶、组织化学染色、抗原-抗体反应检测及定位、疾病诊断、HPLC分析巯基化合物等领域。

[0004] 现有技术中的巯基荧光探针主要有以下几类:第一类为芳香卤代物、丹磺酰氮丙啶类、芘类等,具有良好的选择性和灵敏度,但是这些探针自身具有较强的荧光,用于活体细胞成像时会造成较低的信噪比;第二类为苯并咪唑磺酰卤类探针,其自身荧光较弱,且需要在碱性及高温条件下与巯基反应,也不适合用于生物活体中巯基检测;第三类为乙酰卤衍生物类试剂,存在光稳定性差,荧光基团易失活等不足,无法满足生物活体巯基检测。因此,开发出能够用于活性生物巯基检测的荧光探针成为亟待解决的问题。

[0005] 为了提高信噪比,一个解决方案是降低荧光探针自身的荧光强度。当一个荧光分子(供体)的荧光光谱与另一个荧光分子(受体)的激发光谱重叠时,供体荧光分子的激发能诱导受体荧光分子发出荧光,同时自身荧光强度衰减,利用这种荧光共振能量转移(FRET)效应,可实现受体荧光分子的荧光减弱或淬灭,有望应用于新的活性生物巯基荧光探针的设计中。

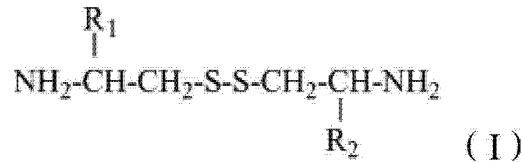
### 发明内容

[0006] 本发明旨在解决上述现有技术中存在的问题,提高活体细胞成像信噪比,提高光稳定性,本发明提供了一种生物巯基荧光探针,所述探针采用第一荧光基团做发射荧光的

能量供体,第二荧光基团或淬灭基团做吸收荧光的能量受体,所述探针结构为 R-S-S-R',其中,R 含有第一荧光基团,R' 含有第二荧光基团或淬灭基团。

[0007] 优选地,所述探针为所述第一荧光基团和第二荧光基团或所述第一荧光基团与淬灭基团分别与如式 I 的化合物两边的 -NH<sub>2</sub> 连接,

[0008]



[0009] 其中,R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub> 各自独立选自 H、C<sub>1-18</sub> 烷基、C<sub>1-18</sub> 烷基取代基的苯基、C<sub>1-18</sub> 取代基的萘基、卤素、羟基、氰基、硝基、杂环基、卤代烷基、烷基氨基、酰胺基或羧基盐。

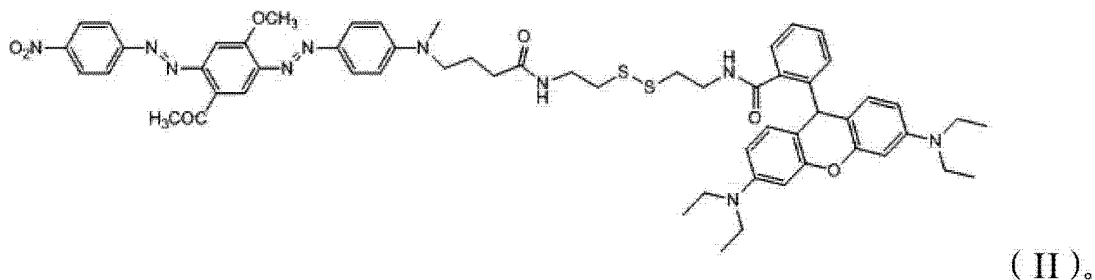
[0010] 优选地,所述第一荧光基团选自异硫氰酸荧光素、罗丹明及其衍生物、羧基荧光素及其衍生物、花青素荧光染料、六氯 -6- 甲基荧光素或二苯基蒽及其衍生物的荧光基团。

[0011] 优选地,所述第二荧光基团选自异硫氰酸荧光素、罗丹明及其衍生物、羧基荧光素及其衍生物、花青素荧光染料、六氯 -6- 甲基荧光素或二苯基蒽及其衍生物的荧光基团。

[0012] 优选地,所述淬灭基团选自 BHQ-1、BHQ-2、BHQ-3 或 4- (4- 二甲基氨基偶氮苯基) 苯甲酸的淬灭基团。

[0013] 优选地,所述荧光探针结构如式 II :

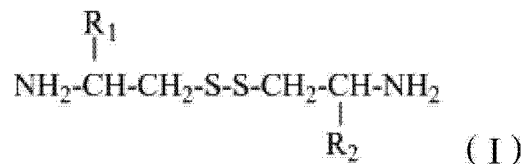
[0014]



[0015] 本发明还提供了一种生物巯基荧光探针的制备方法,包括:

[0016] 在式 I 所示的二硫键骨架上的第二氨基上引入保护基团,形成半封闭二硫键骨架;

[0017]



[0018] 将半封闭二硫键骨架的第一氨基与第一荧光基团连接,形成第一荧光基团 - 半封闭二硫键骨架;

[0019] 将第一荧光基团 - 半封闭二硫键骨架的保护基团脱去,形成第一荧光基团 - 二硫键骨架;

[0020] 第一荧光基团 - 二硫键骨架的第二氨基与第二荧光基团或淬灭基团连接。

[0021] 优选地,所述的保护基团为叔丁氧羰基。

[0022] 优选地,第一氨基与第一荧光基团的连接、第二氨基与第二荧光基团或淬灭基团的连接均为酰胺化反应。

[0023] 优选地,所述酰胺化反应中加入了催化剂 DMAP 和选自 DCC、EDC、DIC 或 BDDC 的缩合剂。

[0024] 本发明还提供了用于检测生物巯基的试剂盒,包括:所述的生物巯基荧光探针和用于洗涤细胞或组织的缓冲液。

[0025] 本发明另外提供了所述的生物巯基荧光探针在生物巯基检测中的应用。

[0026] 本发明还提供了所述的生物巯基荧光探针在化学体系巯基检测中的应用。

[0027] 本发明的有益效果在于,生物巯基探针自身荧光强度衰减或淬灭,提高了成像信噪比,同时,与巯基反应后的荧光稳定性高;本发明的荧光探针的制备方法简单,可在常温、常压、中性 pH 条件下进行。

### 附图说明

[0028] 图 1 是实施例 1 中生物巯基荧光探针的合成路线图。

[0029] 图 2 是实施例 1 中生物巯基荧光探针荧光光谱图。

[0030] 图 3 是实施例 1 中生物巯基荧光探针荧光强度变化图。

[0031] 图 4 是实施例 1 中生物巯基荧光探针检测巯基化合物的荧光强度-谷胱甘肽浓度曲线图。

[0032] 图 5 是实施例 1 中生物巯基荧光探针荧光成像图。

### 具体实施方式

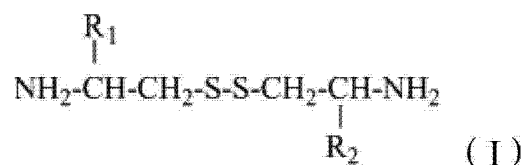
[0033] 为了使本领域的技术人员更好的理解本申请的技术方案,下面将结合本申请实施例中的附图,对本申请实施例中的技术方案进行清楚、完整的描述。

[0034] 本发明利用了荧光共振能量转移(FRET)效应和二硫键与巯基的交换作用,将第一荧光基团做发射荧光的能量供体,第二荧光基团或淬灭基团做吸收荧光的能量受体,分别连接于二硫键骨架的两边,形成了一种生物巯基荧光探针,第一荧光基团与第二荧光基团激发光谱重叠时,第一荧光基团的激发能诱导第二荧光基团发出荧光,自身荧光强度衰减;或第一荧光基团的荧光被淬灭基团吸收,荧光淬灭。当生物巯基存在时,巯基与二硫键发生交换,探针的二硫键打开,探针结构解体,荧光共振能量转移效应解除或荧光淬灭效应解除,第一荧光基团可重新发出荧光。

[0035] 本发明的生物巯基探针结构为 R-S-S-R', 其中,R 含有第一荧光基团,R' 含有第二荧光基团或淬灭基团。

[0036] 在本发明的一个实施例中生物巯基探针的二硫键骨架优选为式 I,

[0037]



[0038] 其中, R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub> 各自独立选自 H、C<sub>1-18</sub> 烷基、C<sub>1-18</sub> 烷基取代基的苯基、C<sub>1-18</sub> 取代基的萘基、卤素、羟基、氰基、硝基、杂环基、卤代烷基、烷基氨基、酰胺基或羧基盐等,优选为 H、C<sub>1-18</sub>

烷基、卤素、酰胺基或羧基盐,更优选为 H 或 C<sub>1-5</sub> 烷基,最优选为 H。

[0039] 所述第一荧光基团选自异硫氰酸荧光素、罗丹明及其衍生物、羧基荧光素及其衍生物、花青素荧光染料、六氯 -6- 甲基荧光素、二苯基蒽及其衍生物、羧基荧光素及其衍生物,衍生物有四氯 -6- 羧基荧光素、2,7- 二甲基 -4,5- 二氯 -6- 羧基荧光素、Alexa Fluor 染料、多甲藻黄素叶绿素蛋白(PerCP)、藻红蛋白(PE)、香豆素系列或吖啶(Acridine);优选为异硫氰酸荧光素、罗丹明及其衍生物、羧基荧光素及其衍生物、花青素荧光染料、六氯 -6- 甲基荧光素或二苯基蒽及其衍生物的荧光基团;更优选为异硫氰酸荧光素或罗丹明及其衍生物的荧光基团;最优选为罗丹明 B 的荧光基团。

[0040] 所述第二荧光基团选自异硫氰酸荧光素、罗丹明及其衍生物、羧基荧光素及其衍生物、花青素荧光染料、六氯 -6- 甲基荧光素、二苯基蒽及其衍生物、羧基荧光素及其衍生物,衍生物有四氯 -6- 羧基荧光素、2,7- 二甲基 -4,5- 二氯 -6- 羧基荧光素、Alexa Fluor 染料、多甲藻黄素叶绿素蛋白(PerCP)、藻红蛋白(PE)、香豆素系列或吖啶(Acridine)的荧光基团;优选为异硫氰酸荧光素、罗丹明及其衍生物、羧基荧光素及其衍生物、花青素荧光染料、六氯 -6- 甲基荧光素或二苯基蒽及其衍生物的荧光基团。

[0041] 所述淬灭基团选自 BHQ-1、BHQ-2、BHQ-3 或 4- (4- 二甲基氨基偶氮苯基) 苯甲酸的淬灭基团;优选为 BHQ-1、BHQ-2 或 BHQ-3 的淬灭基团;更优选为 BHQ-2 的淬灭基团。

[0042] 本发明还提供了所述生物巯基荧光探针的制备方法,将供体或受体分别标记于式 I 的二硫键骨架两端的氨基上,供体或受体与氨基的连接方式优选酯化反应或酰胺化反应。

[0043] 首先,在式 I 所示二硫键骨架的一端氨基上引入保护基团,氨基保护基团可以是烷氧类、酰基类或烷基类,选自苄氧羰基、叔丁氧羰基、苄甲氧羰基、烯丙氧羰基、邻苯二甲酰基、对甲氧基苄基或苄基,优选为苄氧羰基、叔丁氧羰基或苄甲氧羰基,更优选为叔丁氧羰基,最优选为加入二碳酸二叔丁酯与式 I 所示二硫键骨架反应,在式 I 所示二硫键骨架的一端氨基上引入叔丁氧羰基保护基团。

[0044] 然后,利用酯化反应或酰胺化反应在半封闭二硫键骨架的未封闭氨基连接第一荧光基团,所述酰胺化反应中加入了选自缩合剂和催化剂加速反应,所述缩合剂优选为 DCC、EDC、DIC 或 BDDC,本实施例中选用的缩合剂为 DCC,所述催化剂优选为 DMAP。

[0045] 本实施例中选用的技术方案是采用先连接第一荧光基团(供体),也可选择先连接第二荧光基团或淬灭基团(受体)。

[0046] 接着,将连接有第一荧光基团的半封闭二硫键骨架的保护基团脱去,本实施例中采用的是连接有第一荧光基团的半封闭二硫键骨架与氢化剂于有机溶剂中进行加氢反应,脱去叔丁氧羰基。所述的有机溶剂选自烷烃类、甲醇或氯代烷烃,优选为二氯甲烷。所述的氢化剂优选三氟乙酸。

[0047] 最后,利用酯化反应或酰胺化反应在连接有第一荧光基团的二硫键骨架的另一端的氨基上连接第二荧光基团或淬灭基团,所述酰胺化反应中加入了选自缩合剂和催化剂加速反应,所述缩合剂优选为 DCC、EDC、DIC 或 BDDC,本实施例中选用的缩合剂为 DCC,所述催化剂优选为 DMAP。

[0048] 本发明还提供了所述生物巯基荧光探针在生物巯基检测中的应用,包括生物活细胞内的巯基分析检测和荧光成像检测。将细胞或组织样品与所述生物巯基荧光探针混合孵育,后直接测定第一荧光基团的荧光强度或将细胞或组织样品置于平皿中,加入生物巯基

荧光探针混合孵育,再经缓冲液冲洗,进行荧光成像检测。

[0049] 本发明的生物巯基探针还可用于巯基类药物释放的检测,用靶向药物靶点的纳米粒子包裹所述生物巯基探针,形成纳米生物巯基探针,用于检测 N-(2-巯基丙酰基)-甘氨酸、二巯基丙磺酸钠、二巯基丁二酸钠等巯基类药物的释放情况。

[0050] 本发明的生物巯基荧光探针还可用于化学体系巯基检测。

[0051] 本发明另外提供了生物巯基检测试剂盒:包括所述的生物巯基荧光探针和用于洗涤细胞或组织的缓冲液。所述缓冲液优选磷酸缓冲液。

[0052] 以下为实施例。

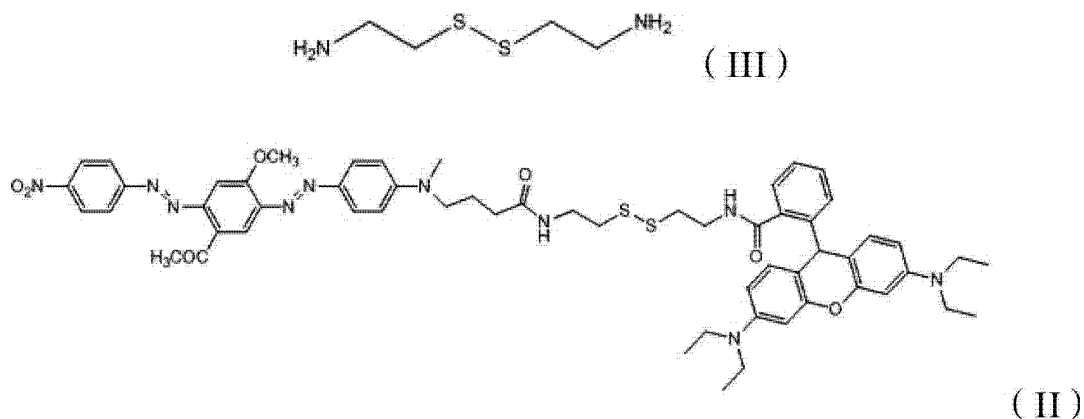
[0053] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。

[0054] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0055] 实施例 1

[0056] 以式 III 所示化合物为二硫键骨架,罗丹明 B (Rhodamine B) 生物荧光基团为供体, BHQ-2 的淬灭基团为受体合成式 II 所示生物巯基荧光探针。

[0057]



[0058] 合成路线如图 1 所示,具体步骤如下:

[0059] (1) 将 2.24g 胱氨二盐酸盐溶于 25mL 甲醇中,再加入 4.18mL 三乙胺,得到第一混合液;将 2.18g 二碳酸二叔丁酯溶于甲醇,在冰浴条件下,用恒压滴液漏斗将二碳酸二叔丁酯溶的甲醇溶液滴入第一混合液中,至滴加完毕共用时 50min,反应 5h,得到半封闭胱氨;并进行纯化。

[0060] (2) 用 20mL 二氯甲烷溶解 252mg 步骤(1)所得半封闭胱氨;在 100mL 圆底烧瓶中依次加入 479mg 罗丹明 B、226mgDCC、24.4mgDMAP,后加入 30mL 二氯甲烷将上述固体溶解,然后在室温下反应 60min;后继续加入半封闭胱氨的甲醇溶液,升温,回流继续反应 6.5h,得到罗丹明 B-半封闭胱氨。

[0061] (3) 在冰浴下,用 4mL 二氯甲烷溶解步骤(2)所得的罗丹明 B-半封闭胱氨,加入 3mL 三氟乙酸,反应 2h 后,得到罗丹明 B-胱氨。

[0062] (4) 将步骤(3)中所得产物用二氯甲烷溶解;用二氯甲烷在 100mL 圆底烧瓶中依次加入 BHQ-2、226mgDCC、24.4mg DMAP,后加入 30mL 二氯甲烷将上述固体溶解,于室温下反应 60min;后继续加入罗丹明 B-胱氨的甲醇溶液,升温,回流继续反应 6.5h,得到式 II 所示化合物。

[0063] 式 II 所示生物巯基荧光探针与巯基化合物反应的荧光光谱变化

[0064] 将式 II 所示生物巯基荧光探针与  $10 \mu\text{mol/L}$  谷胱甘肽混合反应, 5min 后, 测定荧光强度变化, 结果如图 2 所示, 式 II 的荧光探针的激发波长为 580nm。图 3 为式 II 所示生物巯基荧光探针与谷胱甘肽混合反应的荧光强度随时间变化图, 随着反应时间的延长, 荧光强度增加, 当反应时间达到 4000s 后, 曲线趋于平缓, 反应结束。

[0065] 式 II 所示生物巯基荧光探针分析检测实验

[0066] 配置浓度为  $1\text{mol/L}$  的荧光探针, 分别加入浓度为 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2, 5, 10, 50mmol/L 的谷胱甘肽溶液, 使荧光探针终浓度为  $50\text{nmol/L}$ , 反应 60min 后, 测定 580nm 处荧光强度, 以荧光强度为纵坐标, 谷胱甘肽浓度为横坐标绘制曲线, 结果如图 4 所示。由图 4 可知, 所述荧光探针对巯基化合物(以谷胱甘肽为例)的最低检测限为  $5 \times 10^{-6}\text{mol/L}$ , 可满足活性细胞巯基化合物的检测浓度, 还可用于化学体系中巯基化合物的分析检测。荧光强度与谷胱甘肽浓度呈线性关系, 说明本发明的检测方法具有良好的定量检测效果。

[0067] 式 II 所示生物巯基荧光探针荧光检测实验

[0068] 将细胞培养在激光共聚焦专用皿中, 用磷酸缓冲液冲洗 3 次后, 加入一定量的荧光探针, 在  $37^\circ\text{C}$  下孵育 30min, 再用磷酸缓冲液冲洗 1-2 次, 然后进行荧光成像检测。

[0069] 结果如图 5 所示。

[0070] 以上所述的本发明实施方式, 并不构成对本发明保护范围的限定。任何在本发明的精神和原则之内所作的修改、等同替换和改进等, 均应包含在本发明的权利要求保护范围之内。



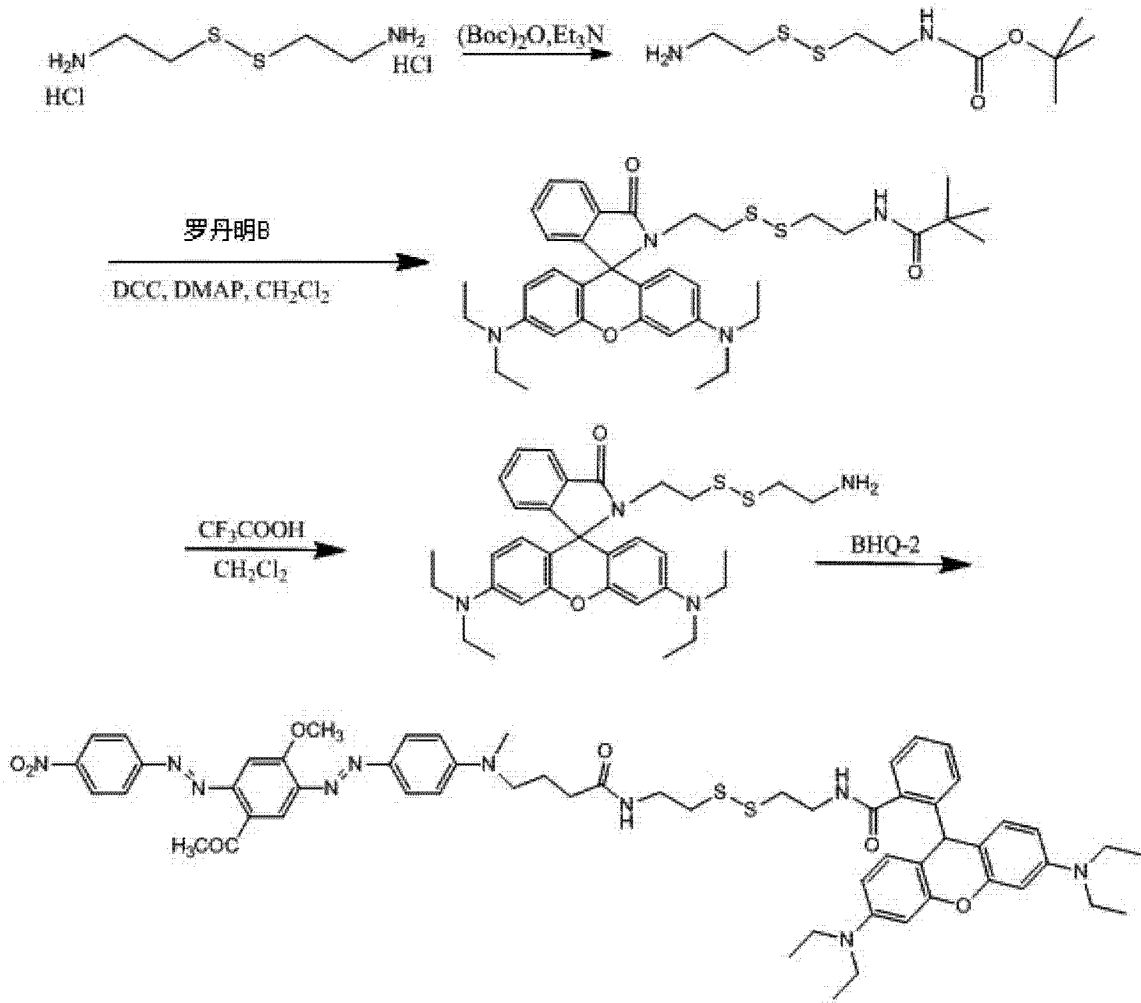


图 1

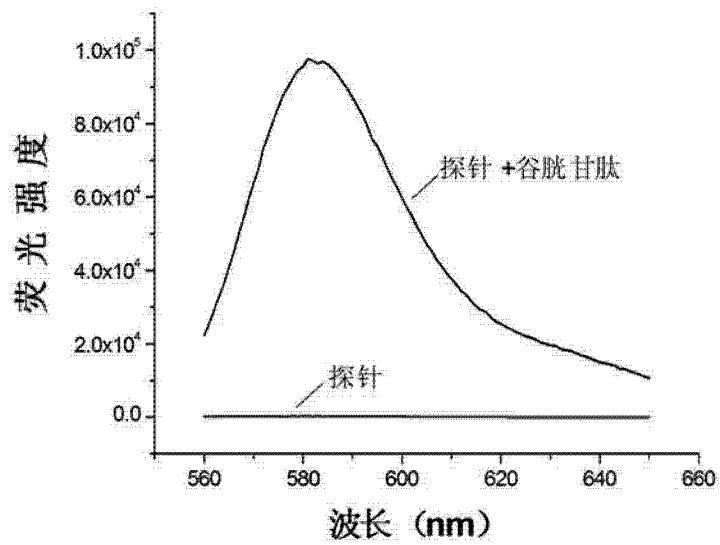


图 2

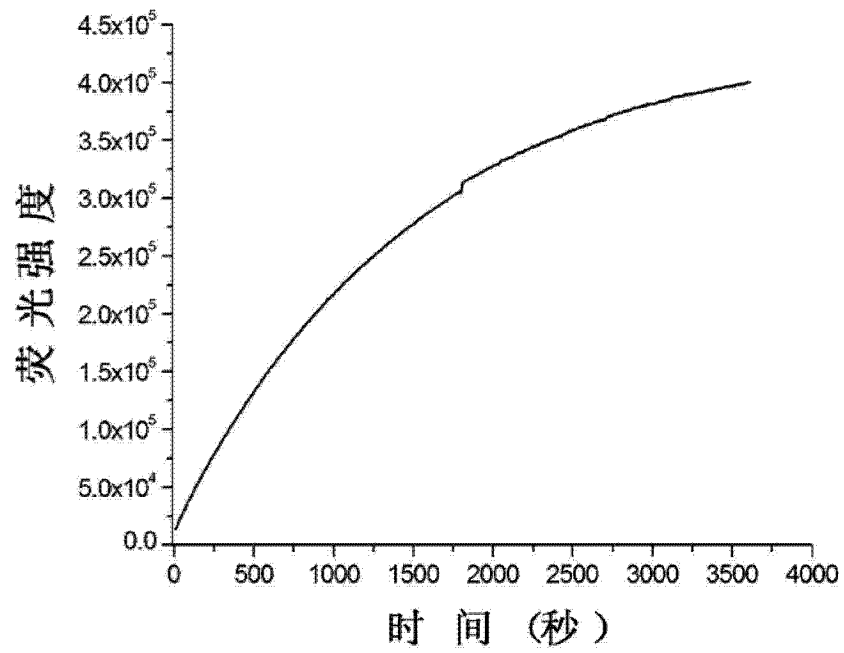


图 3

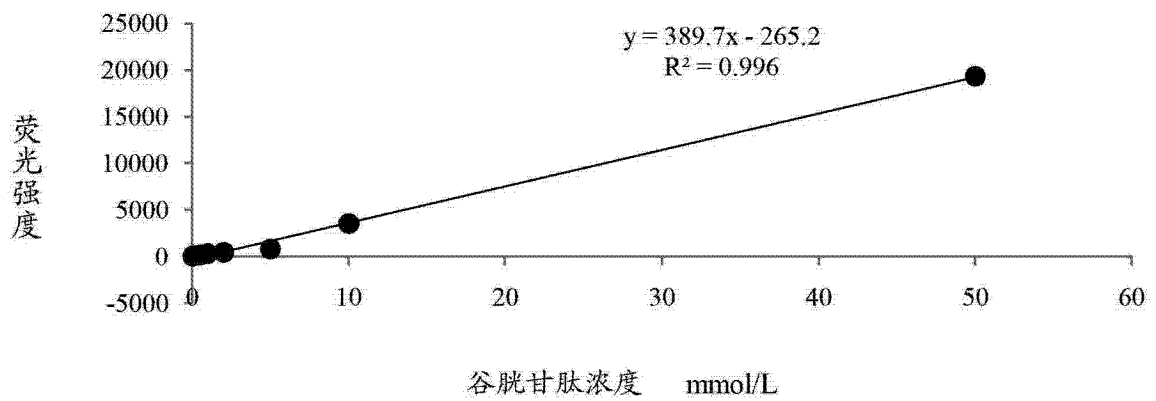


图 4

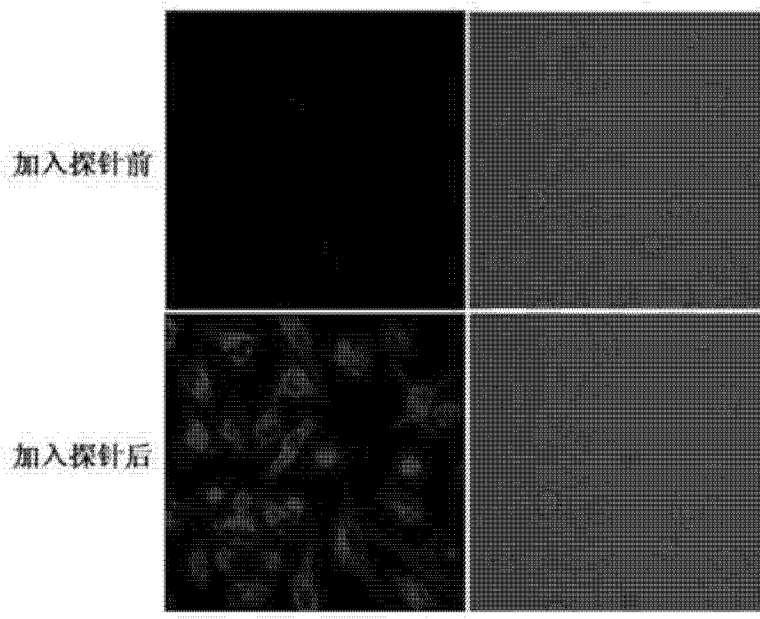


图 5