多肽荧光探针特异性识别细胞中的 Cu^{2+} 和Cys

胡悦¹, 权思齐¹, 李佳楠¹, 孙秀霞^{1,2*}, 肖建喜^{1*}

1. 兰州大学化学化工学院, 兰州 730000

2. 兰州大学生命科学学院, 兰州 730000

*通讯作者, E-mail: sunxx@lzu.edu.cn; xiaojx@lzu.edu.cn.

收稿日期: 2021-05-13; 接受日期: 2021-07-06; 网络版发表日期: 2021-10-08

中央高校基本科研业务费专项资金项目(编号: lzujbky-2018-78)资助

摘要 Cu^{2+} 作为生物体内含量第三多的必需微量金属元素, 在生物体新陈代谢和正常的生命活动中扮演着重要角色, 而体内 Cu^{2+} 的过度积累可能是唐氏综合征、阿尔兹海默症等许多疾病的关键诱因. Cys作为生物体内不可或缺的氨基酸, 参与调控体内蛋白质的合成、翻译后修饰等基本的生理过程, 它的富集可能会引起神经中毒、肝脏损伤、肾结石等疾病. 因此, 实现 Cu^{2+} 和Cys的高效检测对相关疾病的机理研究和治疗至关重要. 本文利用赖氨酸侧链的两个氨基, 与多肽序列中的天冬氨酸反应, 成功合成了发夹式的多肽荧光探针P ((Dansyl-Glu-Asp)₂-Lys)). 研究发现, 多肽荧光探针P通过荧光淬灭效应可以高特异性地识别溶液中的 Cu^{2+} , 而不受其他金属离子的干扰; 并以1:1的比例结合形成P-Cu平台, 该平台可以高选择性地检测Cys. 实验结果表明, 多肽荧光探针P可以“On-Off-On”型响应模式实现对 Cu^{2+} 和Cys的高灵敏检测, 检测限分别为52和43 nmol/L. 并且, 多肽荧光探针P可成功用于HeLa细胞中 Cu^{2+} 和Cys的成像. 这种新型多肽荧光探针P具有优秀的生物相容性、较低的细胞毒性等优点, 可以用于活细胞中 Cu^{2+} 和Cys的特异性检测, 为 Cu^{2+} 和Cys相关疾病的治疗和诊断提供新的手段.

关键词 多肽荧光探针, Cu^{2+} , Cys, 特异性检测, HeLa细胞

1 引言

铜离子(Cu^{2+})作为哺乳动物体内不可缺少的微量金属元素, 广泛存在于各组织和器官中, 参与调控体内基因表达、造血、代谢等各种生理过程^[1~5]. 生物体内适量的铜离子(Cu^{2+})对生物体的健康起到促进作用, 然而体内铜离子(Cu^{2+})过量时, 会导致人体内的脂质代谢紊乱, 引发肝衰竭、肾衰竭、休克或死亡, 同时还可能引起阿尔兹海默症和唐氏综合征等严重疾病的发生^[5~7].

Cys是生物体内一种具有生理功能的常见非必需氨基酸, 是组成蛋白质的20多种氨基酸中唯一具有还原性基团巯基的氨基酸, 参与体内多种氧化还原反应, 对细胞具有一定的保护作用^[8~10]. 生物体内Cys的积累可能会导致肾脏功能障碍和肾结石等疾病^[8~10]. 迄今为止, 在工矿企业和食品加工等行业排出的废水中含有较多的 Cu^{2+} 和Cys, 已经造成了严重的环境污染. 并且, 这些 Cu^{2+} 和Cys会通过农作物、水源以及土壤进入人体内, 严重危害人类的健康和自然界的平衡. 因此, 实现环境及生物体内的 Cu^{2+} 和Cys的高特异性检测对

引用格式: Hu Y, Quan S, Li J, Sun X, Xiao J. A novel fluorescent peptide probe for the specific detection of Cu^{2+} and Cys in cells. *Sci Sin Chim*, 2022, 52: 117–124, doi: 10.1360/SSC-2021-0115

于环境监测、食品以及药品等行业有非常重要的意义。

近年来,人们已经开发了多种技术手段成功用于特异性检测 Cu^{2+} 和Cys^[10]。荧光生物传感器由于灵敏度高和选择性好等优点,在环境、生物学、化学和医学等领域得到广泛关注^[11~14]。2016年, Wang和Jiang等^[9]基于1,8-萘二甲酰亚胺衍生物(NAD)设计了识别Cys和 Cu^{2+} 的敏感荧光探针,该NAD的末端烯烃与Cys反应,导致荧光淬灭,继续加入 Cu^{2+} 后, NAD的席夫碱单元可与 Cu^{2+} 配位,产生荧光恢复。同年, Lin课题组^[10]报道了一种新的荧光探针PI,该荧光探针与 Cu^{2+} 相互作用后,导致荧光淬灭,与Cys反应后,产生了荧光“开启”响应。但上述两种荧光生物传感器都是小分子荧光探针,而小分子荧光探针存在水溶性差、细胞毒性较大等缺陷,极大地限制了其应用。

由于多肽荧光探针具有水溶性好、容易合成、优秀的生物相容性等优点^[15],因此可实现对 Cu^{2+} 和Cys高效检测的多肽荧光探针备受关注。本文报道了一种新型的多肽荧光生物传感器,该多肽荧光生物传感器单独存在时具有很强的荧光强度,在加入 Cu^{2+} 后,基于 Cu^{2+} 的顺磁淬灭传感机制可实现多肽荧光探针P的快速淬灭,从而实现水溶液中 Cu^{2+} 的高特异性识别^[10,16,17,19];而Cys的巯基与 Cu^{2+} 配位,将 Cu^{2+} 从多肽荧光探针分子上脱附,从而达到对 Cu^{2+} 和Cys的高灵敏检测^[10,19]。本文设计的多肽荧光生物传感器可应用于HeLa细胞成像,并有望用于 Cu^{2+} 和Cys相关疾病的机理研究和诊断方面。

2 实验部分

2.1 试剂与仪器

2.1.1 试剂

Fmoc-Asp (OtBu)-OH、Fmoc-Glu (OtBu)-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Rink Amide、HBTU和HOBt购自吉尔生化有限公司(中国)。二氯甲烷(DCM)和 N,N -二甲基甲酰胺(DMF)购自恒兴化学试剂制造有限公司(中国)。无水乙醚和三乙胺购自富宇精细化工有限公司(中国)。三氟乙酸(TFA)、 N,N -二异丙基乙胺(DIEA)和三异丙基硅烷(TIS)购自百灵威科技有限公司(中国)。4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)和丹磺酰氯(Dansyl-Cl)购自索莱宝科技有限公司(中国)。哌嗪购自阿拉丁

生化科技股份有限公司(中国)。所有试剂均为分析级,未进行进一步纯化。所有的溶液用超纯水配制。

2.1.2 仪器

pH计(雷磁pH SJ-4A),电子分析天平(梅特勒电子天平),高速离心机(TG16-WS台式高速离心机,湖南湘仪实验室仪器开发有限公司),荧光分光光度计(日本岛津RF-5301PC荧光分光光度计),荧光显微镜(蔡司研究级荧光显微镜),酶标仪(Tecan Infinite F200/M200)。

2.2 实验方法

2.2.1 多肽荧光探针的合成

多肽荧光探针P (氨基酸序列: (Dansyl-Glu-Asp)₂-Lys)采用标准的Fmoc固相多肽合成策略进行逐步合成。采用0.1 mmol Rink Amide树脂作为固定载体,称取5倍量Fmoc-氨基酸和HBTU,用4~5 mL DMF使其完全溶解后,再加入6倍量DIEA混匀10 min,倒入含有Rink Amide (树脂已活化,并已脱除Fmoc保护基)的注射器中反应3 h。偶联反应结束后,分别用DMF和DCM各洗涤三次,并加入20%哌嗪除去Fmoc保护基团以便进行下一步偶联反应的发生。显色试剂(2%乙醛溶液和2%四氯苯醌溶液混合溶液)用于检测每个偶联反应和Fmoc基团脱保护的完成。每个循环的偶联反应和Fmoc基团脱保护处理步骤相同,直至最后一个氨基酸偶联反应和Fmoc基团脱保护完成。

在室温条件下,向5倍量丹磺酰氯(Dansyl-Cl)中加入8 mL DMF和160 μL 三乙胺使其荧光染料充分溶解。然后倒入到连接多肽的Rink Amide树脂中避光振荡反应4 h,将丹磺酰氯染料修饰到多肽的N-末端,抽干,然后用DMF、DCM和无水甲醇依次洗涤3次,每次5 min。将配制的3 mL多肽切割液(TFA:TIS:H₂O=95:2.5:2.5)倒入到上述被荧光染料修饰的多肽中继续振荡2.5 h以便从树脂上切割多肽。然后将反应液注射到冰乙醚中,使多肽荧光探针沉淀,并将多肽荧光探针沉淀在冰乙醚中重悬,超声处理,离心后收集粗产物,并用质谱表征。荧光多肽探针P计算的分子量为1102.09,ESI-MS测定的分子量为 $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z=1103.41$, $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ $m/z=551.74$ 。

2.2.2 荧光光谱分析

多肽荧光探针样品的荧光发射光谱图通过RF-

5301PC型荧光分光光度计获得(Shimadzu Instruments Ltd., 日本), 以氙灯作为仪器的激发光源. 在20 mmol/L pH 7.4的HEPES缓冲溶液中, 制备多肽荧光探针P、17种金属离子和22种氨基酸溶液以及 S^{2-} 溶液, 在激发波长为330 nm时, 多肽荧光探针P的终浓度为10 μ mol/L.

根据检测限的计算公式 $LOD=3\sigma/k$ 和多肽荧光探针P对 Cu^{2+} 和Cys的定量检测数据可以计算出 Cu^{2+} 和Cys的检测限. 其中 σ 是空白条件下的标准偏差, k 是荧光定量检测曲线的斜率.

2.2.3 细胞毒性

多肽荧光探针P对HeLa细胞的毒性通过CCK-8试剂盒测得. 将100 μ L的HeLa细胞悬浮液(含有1%双抗和10%胎牛血清的DMEM培养基)接种于96微孔板中, 于37 $^{\circ}C$, 5% CO_2 的恒温培养箱中孵育24 h. 然后向HeLa细胞中分别加入不同浓度(12.5, 25, 50, 100和200 μ mol/L)的多肽荧光探针P溶液, 对照组为等量的磷酸盐缓冲溶液(PBS), 继续孵育24和72 h, 再向其中加入CCK-8培养1 h (37 $^{\circ}C$). 最后利用Tecan Infinite F200/M200多功能酶标仪(Tecan, Männedorf, 瑞士)测量每个孔板在450 nm处的吸光度(OD), HeLa细胞的活性以不同浓度条件下4次测量的平均吸收值除以对照组的平均吸收值计算.

2.2.4 HeLa细胞荧光成像

HeLa细胞来源于中国科学院兰州分院. 首先, 将HeLa细胞悬浮液接种于12微孔板(组织处理)中, 在37 $^{\circ}C$ (含有5% CO_2 的恒温培养箱)孵育12 h以保证完全贴壁, 然后向微孔板中加入10 μ mol/L多肽荧光探针P, 在37 $^{\circ}C$ (含有5% CO_2 的恒温培养箱)孵育1 h, 用PBS洗涤3次; 继续向其中含有多肽荧光探针P的微孔板中加入10 μ mol/L的 Cu^{2+} 孵育1 h后, PBS洗涤3次; 最后再向含有多肽荧光探针P和 Cu^{2+} 孵育的微孔板中加入5 μ mol/L的Cys继续孵育1 h, PBS洗涤3次后, 分别通过正置荧光显微镜进行细胞成像.

3 结果与讨论

3.1 多肽荧光探针P的表征

标准Fmoc固相合成的多肽荧光探针P利用高效液相色谱(HPLC)纯化, 并通过质谱仪进行表征(图S1, 网

络版补充材料). 从液相色谱图中观察出多肽探针P在9.849 min处显示最高峰, 纯度95%以上(图S1a). 质谱结果表明成功合成了多肽荧光探针P (图S1b).

3.2 多肽荧光探针P对金属离子的选择性和竞争性研究

为了研究多肽荧光探针P对 Cu^{2+} 的特异性, 首先考察了多肽荧光探针P对17种常见金属离子(K^+ 、 Na^+ 、 Ag^+ 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Cr^{3+} 、 Co^{3+} 、 Fe^{3+} 、 Al^{3+})的选择性识别(图1). 在激发波长330 nm处, 以荧光分光光度计检测多肽荧光探针P单独存在和加入17种金属离子后荧光强度的变化. 研究结果显示, 多肽荧光探针P单独存在时, 溶液具有强的荧光强度, 加入其他金属离子, 多肽荧光探针P的荧光强度没有发生任何程度的降低, 而 Cu^{2+} 的加入, 可导致多肽荧光探针P的荧光强度明显降低(图1a). 此外, 我们还评估了其他金属离子存在(红色)时, Cu^{2+} 对多肽荧光探针P的荧光淬灭能力的影响. 与 Cu^{2+} 单独存在时相比, Cu^{2+} 与其他16种金属离子共同存在时多肽荧光探针P显示出相似的荧光淬灭结果, 表明其他金属离子不影响多肽荧光探针P对 Cu^{2+} 的检测(图1b). 上述结果表明所设计的多肽荧光探针P能够高灵敏高特异性地检测 Cu^{2+} , 而不受其他金属离子的干扰.

3.3 多肽荧光探针P与 Cu^{2+} 的结合实验

3.3.1 多肽荧光探针P对 Cu^{2+} 荧光滴定研究

多肽荧光探针P与 Cu^{2+} 的结合比通过多肽荧光探针P对 Cu^{2+} 的荧光滴定实验确定(图2). 从荧光发射光谱图中可以看出, 当 Cu^{2+} 不存在时, 多肽荧光探针P具有强荧光强度, 随着 Cu^{2+} 浓度不断增加(0.00, 0.10, 0.20, 0.30, ..., 2.0当量), 多肽荧光探针P的荧光强度不断降低(图2a), 当 Cu^{2+} 浓度达到1.0当量或更高时, 多肽荧光探针P的荧光强度不再降低(图2b), 表明多肽荧光探针P与 Cu^{2+} 的结合比为1:1.

此外, 在最大荧光发射波长处, Cu^{2+} 的浓度与多肽荧光探针P的荧光强度之间高度线性相关($R^2=0.99$) (图3). 随着 Cu^{2+} 的浓度增大, 多肽荧光探针P与 Cu^{2+} 结合的比例不断增多, 导致该探针的荧光强度不断降低(图3). 多肽荧光探针P对 Cu^{2+} 的检测, 具有较宽的线性范围(0~1.25 μ mol/L), 以及较低检测限(52 nmol/L)

图1 (a) 在20 mmol/L pH 7.4的HEPES缓冲溶液中, Cu^{2+} 对多肽荧光探针P的荧光淬灭发射光谱图; (b) Cu^{2+} 存在(红色)与不存在(黑色)时, 其他16种金属离子对多肽荧光探针P的干扰柱状图(网络版彩图)

Figure 1 (a) The fluorescence quenching spectra recorded for the peptide probe P in the presence of Cu^{2+} ; (b) the fluorescence intensities measured for the probe P in the presence of other metal ions (black) and together with Cu^{2+} (red) in the HEPES buffer at pH 7.4 (20 mmol/L) (color online).

图2 (a) 在20 mmol/L pH 7.4的HEPES缓冲溶液中, 不同浓度的 Cu^{2+} 对多肽荧光探针P的荧光淬灭能力产生的一系列荧光发射光谱图; (b) 在最大荧光发射波长处, 多肽荧光探针P的荧光强度与 Cu^{2+} 浓度的相关曲线图(网络版彩图)

Figure 2 (a) The fluorescence quenching spectra recorded for the peptide probe P in the presence of various concentrations of Cu^{2+} ; (b) the fluorescence intensity monitored at the maximum fluorescence emission wavelength as a function of the concentration of Cu^{2+} in the HEPES buffer at pH 7.4 (20 mmol/L) (color online).

(图3)。这些结果表明多肽荧光探针P能够高效检测 Cu^{2+} 。

3.3.2 Job工作曲线测定

本文利用Job工作曲线进一步研究了多肽荧光探针P与 Cu^{2+} 的结合比。保持多肽荧光探针P和 Cu^{2+} 总摩尔浓度为10 $\mu\text{mol/L}$, 在荧光最大发射波长处检测多肽荧光探针P与 Cu^{2+} 以不同摩尔浓度比混合时的荧光强度。从图4中可以看出, 多肽荧光探针P与 Cu^{2+} 摩尔浓度比约为1时荧光强度最高。Job工作曲线结果表明多

肽荧光探针P和 Cu^{2+} 可能形成了1:1复合物。

3.4 P-Cu平台对Cys的选择性和竞争性研究

为了研究Cys对P-Cu平台的特异性, 我们利用P-Cu平台检测了21种氨基酸(Cys、Glu、Asp、Asn、Phe、Ala、Gln、Thr、Ser、Tyr、Lys、Trp、Pro、Gly、Val、Met、Leu、Ile、Arg、His、Hcy)、GSH以及 S^{2-} 的选择性。从图5a荧光发射光谱中看出, 与Cys相比, 其他氨基酸、GSH以及 S^{2-} 对P-Cu平台的荧光恢复很弱, 表明P-Cu平台对Cys具有非常好的选择性。此外,

图3 在20 mmol/L HEPES pH 7.4缓冲溶液中, 最大荧光发射波长处 Cu^{2+} 的浓度与多肽荧光探针P荧光强度的线性关系
Figure 3 The changes of the fluorescence intensity monitored at $I_{\max}$ (the maximum emission intensity) as a function of the concentration of Cu^{2+} in 20 mmol/L HEPES at pH 7.4.

图4 在20 mmol/L HEPES pH 7.4缓冲溶液中, 多肽荧光探针P与 Cu^{2+} 的Job工作曲线图. $[\text{P}]+[\text{Cu}^{2+}]$ 总摩尔浓度为10 $\mu\text{mol/L}$

Figure 4 A Job's plot for the peptide probe P with Cu^{2+} in 20 mmol/L HEPES at pH 7.4. Total $[\text{P}]+[\text{Cu}^{2+}]=10 \mu\text{mol/L}$.

我们还研究了其他氨基酸、GSH以及 S^{2-} 存在(红色)时, Cys对P-Cu平台荧光恢复能力的影响. 与Cys单独存在时相比, Cys与其他氨基酸、GSH以及 S^{2-} 共同存在时P-Cu平台显示出相似的荧光恢复能力, 表明其他氨基酸、GSH以及 S^{2-} 的存在不会影响P-Cu平台对Cys的检测(图5b). 上述结果表明P-Cu平台能够高特异性地检测Cys, 而不受其他氨基酸、GSH以及 S^{2-} 的干扰.

图5 (a) 在20 mmol/L pH 7.4的HEPES缓冲溶液中, P-Cu平台检测21种氨基酸、GSH和 S^{2-} 的荧光发射光谱图; (b) Cys存在(红色)与不存在(黑色)时, 其他氨基酸、GSH以及 S^{2-} 对P-Cu平台的干扰柱状图(网络版彩图)

Figure 5 (a) The fluorescence emission profiles recorded for the P-Cu biosensor in the presence of 21 amino acids, GSH and S^{2-} ; (b) the fluorescence intensities measured for the P-Cu biosensor in the presence of other anions (black) and together with Cys (red) in 20 mmol/L HEPES at pH 7.4 (color online).

3.5 P-Cu平台对Cys的荧光滴定研究

为了研究Cys对P-Cu平台的荧光恢复情况, 本文检测了不同当量的Cys条件下, P-Cu平台的荧光发射光谱图(图6a). 从荧光发射光谱图可看出, Cys不存在时, P-Cu平台具有较低的荧光强度; 随着Cys浓度不断增加, P-Cu平台的荧光强度不断增加(图6a); 当Cys浓度达到0.5当量或更高时, P-Cu平台的荧光强度不再增加(图6b).

为了研究该P-Cu平台是否能定量检测Cys, 我们得到了P-Cu平台与不同浓度的Cys (0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0和1.2 $\mu\text{mol/L}$)混合后最大发射波长处的荧光强度(图7). 结果表明, 混合物的荧光强度与Cys的

图6 (a) 在20 mmol/L pH 7.4的HEPES缓冲溶液中, 不同浓度的Cys对P-Cu平台的荧光恢复产生一系列荧光发射光谱图; (b) 在最大荧光发射波长处, P-Cu平台的荧光强度与Cys浓度相关曲线图(网络版彩图)

Figure 6 (a) The fluorescence restoration spectra recorded for the P-Cu biosensor in the presence of various concentrations of Cys; (b) the fluorescence intensity monitored at the maximum fluorescence emission wavelength as a function of the concentration of Cys in 20 mmol/L HEPES at pH 7.4 (color online).

浓度之间高度线性相关($R^2=0.99$) (图7). P-Cu平台对Cys的检测具有较宽的线性范围(0~1.2 $\mu\text{mol/L}$), 最后, 根据检测限的计算公式 $\text{LOD}=3\sigma/k$ 和P-Cu平台对Cys的定量检测数据, 计算出Cys的检测限为43 nmol/L, 证明P-Cu平台可对Cys实现高灵敏检测.

3.6 HeLa细胞成像研究

本文首先研究了多肽荧光探针P的细胞毒性. 从图8中可以看出孵育24 h时不同浓度的多肽荧光探针P均显示相似的细胞存活率, 多肽荧光探针P的浓度较高时, 细胞存活率达到90%以上; 孵育72 h时, 相同浓度

图7 在20 mmol/L HEPES pH 7.4缓冲溶液中, 最大荧光发射波长处, Cys的浓度与P-Cu平台荧光强度的线性关系

Figure 7 The changes of the fluorescence intensity monitored at I_{max} (the maximum emission intensity) as a function of the concentration of Cys in 20 mmol/L HEPES at pH 7.4.

图8 不同浓度的多肽荧光探针P的细胞毒性

Figure 8 The cytotoxicity of the peptide probe P with various concentrations.

的多肽荧光探针P中的细胞存活率仍然可以达到85%以上(图S2), 表明多肽荧光探针P具有很好的生物相容性, 可用于HeLa细胞成像研究.

在20 mmol/L pH 7.4的HEPES缓冲溶液体系中, 多肽荧光探针P对 Cu^{2+} 和Cys表现出非常高的灵敏性. 通过研究多肽荧光探针P对HeLa细胞的成像发现, 多肽荧光探针P在HeLa细胞内可以实现 Cu^{2+} 和Cys的检测. 从图9a~c中可以看出, 仅有多肽荧光探针P时, HeLa细胞表现出较强的绿色荧光, 由于HeLa细胞自身不发光, 表明多肽荧光探针P可以穿透HeLa细胞膜. 当加入 Cu^{2+} 后, HeLa细胞的绿色荧光被明显淬灭, 表明该多肽荧

图 9 HeLa细胞的荧光成像实验. (a) 多肽荧光探针P (10 $\mu\text{mol/L}$) 孵育1 h的荧光图; (d) 向P (10 $\mu\text{mol/L}$) 中加入 Cu^{2+} 孵育1 h的荧光图; (g) 向P-Cu平台中继续加入Cys孵育1 h的荧光图; (b, e, h)和(c, f, i)分别为对应的明场图和叠加图(网络版彩图)

Figure 9 The fluorescence images of HeLa cells: fluorescence images of cells after incubation with P (10 $\mu\text{mol/L}$) (a), P and Cu^{2+} (d), P-Cu and Cys (g) for 1 h. Bright-field images (b, e, h) and merged images (c, f, i) correspond to the fluorescence images (a, d, g), respectively (color online).

光探针P可以靶向检测HeLa细胞中的 Cu^{2+} (图9d~f); 再继续加入Cys后, HeLa细胞内的绿色荧光恢复, 表明P-Cu平台可以靶向结合HeLa细胞中的Cys (图9g~i). 上述结果表明, 多肽荧光探针P具有优秀的生物相容性和强的渗透能力, 可以用于HeLa细胞中 Cu^{2+} 和Cys的检测, 多肽荧光探针P荧光的变化趋势与溶液中的检测基本保持一致, 为以后在生物体内实现 Cu^{2+} 和Cys的检测提供了强有力的工具.

4 结论

Cu^{2+} 和Cys是生物体内非常重要的两种物质, 它们

在体内的含量异常会导致许多严重疾病的发生, 对 Cu^{2+} 和Cys的高效检测有助于实现相关疾病的早期诊断和治疗. 本文设计合成的新型多肽荧光探针P具有选择性好、灵敏度高、生物相容性好等优点. 多肽荧光探针P可以高特异性地检测 Cu^{2+} , 导致该多肽荧光探针P的荧光淬灭. 而向形成的P-Cu平台继续加入Cys后, P-Cu平台的荧光恢复. 本文开发的新型多肽荧光探针P可以实现 Cu^{2+} 和Cys的高效检测, 并成功用于HeLa细胞中 Cu^{2+} 和Cys的靶向检测. 该多肽荧光探针P对于 Cu^{2+} 和Cys相关疾病的病理研究和早期诊断有非常广泛的应用潜力.

补充材料

本文的补充材料见网络版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 Uauy R, Olivares M, Gonzalez M. *Am J Clin Nutr*, 1998, 67: 952S–959S
- 2 Tapiero H, Townsend DM, Tew KD. *Biomed Pharmacother*, 2003, 57: 386–398
- 3 Jung HS, Kwon PS, Lee JW, Kim JI, Hong CS, Kim JW, Yan S, Lee JY, Lee JH, Joo T, Kim JS. *J Am Chem Soc*, 2009, 131: 2008–2012
- 4 Kobayashi H, Ogawa M, Alford R, Choyke PL, Urano Y. *Chem Rev*, 2010, 110: 2620–2640
- 5 Crisponi G, Nurchi VM, Fanni D, Gerosa C, Nemolato S, Faa G. *Coord Chem Rev*, 2010, 254: 876–889

- 6 Quarles CD, Macke M, Michalke B, Zischka H, Karst U, Sullivan P, Field MP. *Metallomics*, 2020, 12: 1348–1355
- 7 Jung HS, Kwon PS, Lee JW, Kim JI, Hong CS, Kim JW, Yan S, Lee JY, Lee JH, Joo T, Kim JS. *J Am Chem Soc*, 2009, 131: 2008–2012
- 8 Jia MY, Niu LY, Zhang Y, Yang QZ, Tung CH, Guan YF, Feng L. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2015, 7: 5907–5914
- 9 Shen R, Yang JJ, Luo H, Wang B, Jiang Y. *Tetrahedron*, 2017, 73: 373–377
- 10 Liu Y, Meng F, Lin W. *RSC Adv*, 2016, 6: 30951–30955
- 11 Liu J, Sun YQ, Huo Y, Zhang H, Wang L, Zhang P, Song D, Shi Y, Guo W. *J Am Chem Soc*, 2014, 136: 574–577
- 12 Jiang T, Guo D, Wang Q, Wu X, Li Z, Zheng Z, Yin B, Xia L, Tang J, Luo W, Xia N, Jiang Y. *Anal Chim Acta*, 2015, 876: 77–82
- 13 Li DP, Wang ZY, Cao XJ, Cui J, Wang X, Cui HZ, Miao JY, Zhao BX. *Chem Commun*, 2016, 52: 2760–2763
- 14 Yu M, Wu X, Lin B, Han J, Yang L, Han S. *Anal Chem*, 2015, 87: 6688–6695
- 15 Wang P, Wu J, Su P, Xu C, Ge Y, Liu D, Liu W, Tang Y. *Dalton Trans*, 2016, 45: 16246–16254
- 16 Jung KH, Lee KH. *Anal Chem*, 2015, 87: 9308–9314
- 17 Koch KA, Peña MMO, Thiele DJ. *Chem Biol*, 1997, 4: 549–560
- 18 Harford C, Sarkar B. *Acc Chem Res*, 1997, 30: 123–130
- 19 Lim MH, Wong BA, Pitcock Jr. WH, Mokshagundam D, Baik MH, Lippard SJ. *J Am Chem Soc*, 2006, 128: 14364–14373

A novel fluorescent peptide probe for the specific detection of Cu²⁺ and Cys in cells

Yue Hu¹, Siqi Quan¹, Jianan Li¹, Xiuxia Sun^{1,2*}, Jianxi Xiao^{1*}

¹ College of Chemistry and Chemical Engineering, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China

² School of Life Sciences, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China

*Corresponding authors (email: sunxx@lzu.edu.cn; xiaojx@lzu.edu.cn)

Abstract: As the third most abundant essential trace elements in the organism, Cu²⁺ plays an important role in normal physiological activities and metabolism, while excessive Cu²⁺ has been found to be closely related to serious diseases such as Down's syndrome and Alzheimer's disease. As an indispensable amino acid in the organism, Cys participates in the regulation of protein synthesis, post-translational modification and other biological functions. However, its pronounced accumulation may cause neurotoxicity, liver damage, kidney stones and other diseases. Therefore, the development of efficient assays for Cu²⁺ and Cys is critical for the diagnosis and treatment of these diseases. We have synthesized a hairpin type fluorescent peptide probe P ((Dansyl-Glu-Asp)₂-Lys) by using two amino groups in the side chain of lysine to react with aspartic acid in the peptide sequence. We found that the peptide probe P can highly specifically detect Cu²⁺ by fluorescence quenching without the interferences of other metal ions. The formation of P-Cu biosensor at 1:1 stoichiometry can highly selectively detect Cys and recover its fluorescence. We have demonstrated that the fluorescent peptide probe P provides an "On-Off-On" sensing mode for Cu²⁺ and Cys with detection limits of 52 and 43 nM, respectively. The fluorescent peptide probe P has been successfully used for the imaging of Cu²⁺ and Cys in HeLa cells. The newly developed fluorescent peptide probe P has extraordinary features such as good biocompatibility, low biotoxicity, and high specificity of Cu²⁺ and Cys, which shows new detection method in the studies of various Cu²⁺/Cys-involved diseases.

Keywords: fluorescent peptide probe, Cu²⁺, Cys, specific detection, HeLa cells

doi: [10.1360/SSC-2021-0115](https://doi.org/10.1360/SSC-2021-0115)