荧光多肽探针靶向检测细胞和斑马鱼中的 Cu^{2+} 和 S^{2-}

胡悦¹, 权思齐¹, 李咏欣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: 2020-12-21; 接受日期: 2021-02-02; 网络版发表日期: 2021-04-15

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

摘要 Cu^{2+} 作为人体内含量最多的微量元素之一, 在人正常的生理活动和新陈代谢中发挥着重要作用, 而体内过量的 Cu^{2+} 则被发现与唐氏综合症、阿尔兹海默症等严重疾病密切相关. S^{2-} 作为人体内广泛存在的阴离子, 参与调控细胞内的氧化还原平衡、细胞凋亡、胰岛素分泌等各种生理过程, 它的过度积累可能是阿尔兹海默症、帕金森的关键诱因. 本文构建了一个 Dansyl 修饰的六肽荧光探针 P (Dansyl-Asp-Glu-Pro-Gly-Ser-His), 发现多肽探针 P 可以高特异地识别 Cu^{2+} , 而不受其他离子的干扰; 它与 Cu^{2+} 以 2:1 的比例结合形成配合物 2P-Cu, 导致多肽探针的荧光淬灭. 该配合物可以高选择性地检测 S^{2-} , S^{2-} 的加入会置换出配合物中的 Cu^{2+} , 从而恢复多肽探针的荧光. 荧光实验表明, 多肽探针 P 以 “On-Off-On” 的响应模式, 实现对 Cu^{2+} 和 S^{2-} 的高灵敏检测, 检测限分别为 160 和 85 nM. 并且, 多肽探针 P 可成功用于活细胞和斑马鱼中 Cu^{2+} 和 S^{2-} 的成像. 本文开发的新型荧光多肽探针具有生物相容性好、细胞毒性低等优点, 可以用于细胞和活体中 Cu^{2+} 和 S^{2-} 的靶向检测, 在 Cu^{2+} 和 S^{2-} 相关疾病的机理研究和诊断中具有广泛的应用潜力.

关键词 荧光多肽探针, Cu^{2+} , S^{2-} , 特异性检测, 斑马鱼

1 引言

铜离子(Cu^{2+})作为人体内含量第三多的必需微量元素, 参与调控组织和器官的各种正常生理活动^[1,2]. 生物体内的铜离子(Cu^{2+})平衡十分重要, 适量的铜离子(Cu^{2+})对人的健康有益, 然而机体中铜离子(Cu^{2+})摄入过多时, 会在肝脏内富集, 导致人体内的蛋白质发生不可逆转的变性, 同时引起阿尔兹海默症和

唐氏综合征等严重疾病^[3].

H_2S 是人体内一种重要的内源性分子, 在细胞内的氧化还原平衡、细胞凋亡、胰岛素分泌等生理过程中发挥重要作用^[4,5]. 人体内 H_2S 的浓度异常可能会导致阿尔兹海默症和帕金森等疾病^[6,7]. Cu^{2+} 与 S^{2-} 在众多领域广泛应用, 已经导致严重的环境污染问题, 并且这些污染物会通过水源和土壤在人体内积累, 进而危害人的身体健康^[8]. 因此, 高特异性检测环境及人体内的

引用格式: Hu Y, Quan S, Li Y, Sun X, Xiao J. A novel fluorescent peptide probe for the specific detection of Cu^{2+} and S^{2-} in cells and zebrafish. *Sci Sin Chim*, 2021, 51: 558–565, doi: 10.1360/SSC-2020-0233

Cu^{2+} 和 S^{2-} 具有十分重要的意义。

目前检测 Cu^{2+} 和 S^{2-} 的方法有原子吸收法、质谱法和气相色谱法等,但这些方法的检测成本比较高,不能原位实时检测,在生物实际样品中的应用也受到了极大的限制^[9]。荧光分析方法由于操作简单、灵敏度高、用量少和选择性好等优点,在生物、化学等领域的应用一直备受关注^[10]。2012年, Li和Pan课题组^[11]基于香豆素设计了识别铜离子的荧光化学传感器,但该荧光化学传感器的检测体系为乙腈和HEPES缓冲的混合溶液,不能用于生物实际样品的检测。2009年, Chang课题组^[12]以荧光素为荧光团,设计了以铜离子配位形成的荧光化学传感器来检测 H_2S , 但该荧光化学传感器对硫离子的检测限较高。

小分子探针存在细胞毒性、水溶性差等缺点,而多肽探针具有优良的生物相容性和水溶性、便于荧光基团修饰等优点,在生物大分子和金属离子的检测中应用越来越广泛。截至目前,已经报道了几种荧光多肽探针可以检测不同的离子^[13]。最近, Tang课题组^[14]报道了一种多肽生物传感器,可以实现 Cu^{2+} 和 S^{2-} 的高灵敏检测,表明荧光多肽探针在金属离子和阴离子的检测中有较好的发展潜力。我们构建了一种新型的荧光多肽探针,它可以用于高特异性地识别 Cu^{2+} 和 S^{2-} ,并成功地用于HeLa细胞和斑马鱼中 Cu^{2+} 和 S^{2-} 的靶向成像,该探针在 Cu^{2+} 和 S^{2-} 相关疾病的机理研究和诊断中具有有良好的应用前景。

2 实验部分

2.1 试剂与仪器

Fmoc-Asp (OtBu)-OH、Fmoc-Glu (OtBu)-OH、Fmoc-Ser (tBu)-OH、Fmoc-His (Trt)-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Pro-OH、Rink Amide、HBTU和HOBT购自吉尔生物有限公司(中国)。二氯甲烷(DCM)、*N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)、三乙胺和无水乙醚购自富宇精细化工有限公司(中国)。三氟乙酸(TFA)、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。

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), 飞行时间质谱仪(美国布鲁克公司), 荧光显微镜(蔡司研究级荧光显微镜), 酶标仪(Tecan Infinite M200)。

2.2 实验方法

2.2.1 多肽的合成

多肽采用标准的Fmoc固相合成方法合成。首先称取228 mg (5 eq.) Fmoc-His (Trt)-OH和278 mg (5 eq.) HBTU, 用4~5 mL DMF使其完全溶解, 同时加入165 μL DIEA混匀10 min, 加入200 mg Rink Amide (树脂已活化, 并已脱除Fmoc保护基)在注射器中反应3 h。偶联反应结束后, 将上述反应混合物用DMF (3 $\times$ 3.5 mL)和DCM (3 $\times$ 3.5 mL)交替洗涤3次, 然后加入20%哌嗪除去Fmoc保护基团。2%乙醛溶液和2%四氯苯醌溶液混合溶液(显色试剂)用于检测偶联反应和Fmoc基团脱保护的完成, 可以进行下一个Fmoc-氨基酸的连接和Fmoc基团的脱保护。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, 以便进行荧光基团的修饰。

称取108 mg (5 eq.)丹磺酰氯(Dansyl-Cl), 倒入10 mL离心管中, 加入4 mL DMF和80 μL 三乙胺使其荧光染料充分溶解。将溶解后的染料加入上述最后一个氨基酸(脱Fmoc基团保护)的多肽合成注射器中, 避光反应4 h, 抽干, 然后用DMF、DCM和无水甲醇洗涤3次, 每次5 min。将丹磺酰氯荧光染料修饰到多肽的N-末端之后, 将现配制的4 mL TFA:TIS:H₂O=95:2.5:2.5多肽切割液倒入上述被荧光染料修饰的多肽中振荡3 h以便从树脂上切割。然后将反应液注射到冰乙醚中, 收集多肽沉淀, 并将多肽产物在冰乙醚中洗涤3次, 离心后收集粗产物。使用反相液相色谱C18柱分离纯化目标多肽探针, 并用质谱表征。荧光多肽探针P计算的分子量为873.12, ESI-MS测定的分子量为 $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z=874.009$, $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ $m/z=437.359$ 。

2.2.2 荧光光谱分析

荧光多肽探针样品的荧光发射光谱图是利用RF-5301PC荧光分光光度计获得。将荧光多肽探针、阳离子和阴离子分别溶于20 mmol/L pH 7.4的HEPES缓冲溶液中, 荧光检测时, 激发波长为330 nm, 步长1 nm, 荧

光多肽探针的终浓度为 $10\text{ }\mu\text{mol/L}$ 。

根据检测限的计算公式 $\text{LOD}=3\sigma/k$ 和荧光多肽探针针对 Cu^{2+} 和 S^{2-} 的定量检测数据可以计算出 Cu^{2+} 和 S^{2-} 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。对于 Cu^{2+} 检测限计算公式中标准偏差(σ)是仅存在荧光多肽探针P时测量的荧光数据的标准偏差, S^{2-} 检测限计算公式中标准偏差(σ)是仅存在2P-Cu体系时测量的荧光数据的标准偏差。

2.2.3 细胞毒性

采用CCK-8试剂盒测定荧光多肽探针P的细胞毒性。HeLa细胞被培养在 37°C 、5% CO_2 的恒温培养箱中24 h。然后向HeLa细胞中加入12.5、25、50、100和 $200\text{ }\mu\text{mol/L}$ 的荧光多肽探针P孵育24 h, 最后向其中加入CCK-8培养1 h, 通过酶标仪测量每个孔板的光密度(OD)值, 计算HeLa细胞的存活率。

2.2.4 荧光成像

HeLa细胞来源于中国科学院兰州分院。HeLa细胞在含有10%胎牛血清和2%双抗的DMEM培养基中培养12 h, 向其中加入 $10\text{ }\mu\text{mol/L}$ 的荧光多肽探针P孵育1 h, 用磷酸缓冲溶液(PBS)洗涤3次, 通过蔡司研究级正置荧光显微镜进行成像; 随后向其中加入 $5\text{ }\mu\text{mol/L}$ 的 Cu^{2+} 培养1 h后, PBS洗涤3次, 通过正置荧光显微镜成像; 最后再加入 $30\text{ }\mu\text{mol/L}$ 的 S^{2-} 孵育1 h, 洗涤3次后, 通过正置荧光显微镜进行成像。

斑马鱼培养在E3培养液中, 培养温度为 28°C , 将 $10\text{ }\mu\text{mol/L}$ 的荧光多肽探针P加入到培养5天的斑马鱼幼崽中, 让其与P一起孵育1 h, 然后用0.01%的MS 222将斑马鱼幼崽洗涤3次, 通过Olympus BX51荧光共聚焦显微镜成像; 再向其中加入 $5\text{ }\mu\text{mol/L}$ 的 Cu^{2+} 孵育1 h, 用0.01%的MS 222将斑马鱼幼崽洗涤3次, 通过Olympus BX51荧光共聚焦显微镜成像; 最后向其中加入 $30\text{ }\mu\text{mol/L}$ 的 S^{2-} 孵育1 h, 用0.01%的MS 222将斑马鱼幼崽洗涤3次, 通过Olympus BX51荧光共聚焦显微镜成像。

3 结果与讨论

3.1 荧光多肽探针P的表征

固相合成的荧光多肽探针P利用高效液相色谱

(HPLC)进行纯化, 并通过质谱技术进行表征(图S1, 网络版补充材料)。从荧光多肽探针P的液相色谱图可以看出在7.384 min处显示最高峰, 纯度95%以上(图S1(a))。质谱结果表明成功合成了新型荧光多肽探针P(图S1(b))。

3.2 荧光多肽探针P对金属离子响应性

为了研究荧光多肽探针P对 Cu^{2+} 的高特异性, 首先研究了16种金属离子(K^{+} 、 Na^{+} 、 Ag^{+} 、 Cd^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Cr^{3+} 、 Co^{3+} 、 Fe^{3+} 、 Al^{3+} 、 Zn^{2+})与荧光多肽探针P的相互作用(图1)。荧光多肽探针P单独存在时显示出强的荧光强度, Cu^{2+} 加入时, 基于 Cu^{2+} 的顺磁性淬灭机制使荧光多肽探针P荧光强度明显地被淬灭(图1(a)), 实现了“Turn-off”型荧光响应模式。其他金属离子的加入使荧光多肽探针P的荧光强度仅发生很小程度的淬灭(图1(b))。这些结果表明新型设计的荧光多肽探针P可以高特异性地识别 Cu^{2+} , 而不受其他金属离子的干扰。

3.3 荧光多肽探针P与 Cu^{2+} 的结合实验

3.3.1 荧光多肽探针P与 Cu^{2+} 的相互作用

利用 Cu^{2+} 对荧光多肽探针P的荧光滴定实验, 本文研究了 Cu^{2+} 对荧光多肽探针P的荧光淬灭情况。荧光多肽探针P和 Cu^{2+} 分别溶解于 20 mmol/L pH 7.4的HEPES缓冲溶液中, 向含有 $20\text{ }\mu\text{L}$ 10^{-3} mol/L P的2 mL HEPES缓冲溶液中依次加入0.001、0.05、0.1、0.15…1.0当量的 Cu^{2+} , 在激发波长为330 nm条件下分别进行荧光测定, 并记录荧光发射光谱图(图2(a)), 进而得到 Cu^{2+} 对荧光多肽探针P的荧光滴定趋势图(图2(b))。从图2可知, 随着 Cu^{2+} 浓度增加, P的荧光强度逐渐减弱, 当 Cu^{2+} 浓度达到0.5当量($0.5\times 10^{-3}\text{ mol/L}$)或更高时, 荧光多肽探针P的荧光强度不再减弱。结果表明荧光多肽探针与 Cu^{2+} 结合比为2:1。

此外, 在最大荧光发射波长处, Cu^{2+} 的浓度与荧光多肽探针P的荧光强度之间高度线性相关($R^2=0.99$)(图S2(a))。随着 Cu^{2+} 的浓度增大, 荧光多肽探针P的荧光强度持续降低, 荧光多肽探针P对 Cu^{2+} 的检测, 具有较宽的线性范围($0\sim 1.4\text{ }\mu\text{mol/L}$), 以及较低的检测限(160 nm)(图S2(a))。上述结果表明荧光多肽探针P对 Cu^{2+} 能够进行高效检测。

图 1 在 pH 7.4 的 HEPES 缓冲溶液中, Cu^{2+} 对荧光多肽探针 P 的荧光淬灭发射光谱图(a)和 Cu^{2+} 存在(红色)与不存在(黑色)时, 其他 15 种金属离子对多肽探针 P 的干扰柱状图(b) (网络版彩图)

Figure 1 (a) The fluorescence quenching spectra were recorded for the probe peptide P in the presence of Cu^{2+} , and (b) the fluorescence intensities were 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 (color online).

3.3.2 Job 工作曲线测定

通过测定荧光多肽探针 P 与 Cu^{2+} 的 Job 工作曲线确定荧光多肽探针 P 与 Cu^{2+} 的结合比。此方法是在 2 mL 的 HEPES 缓冲溶液中, P 的体积从 20 μL 依次递减到 0 μL , 此时 Cu^{2+} 的体积依次从 0 μL 增加到 20 μL , 且保持荧光多肽探针 P 和 Cu^{2+} 溶液滴加体积之和为 20 μL (摩尔浓度为 10^{-3} mol/L)。根据荧光检测结果作图, 从图 3 可看出存在最高点, 此最高点的位置对应于荧光多肽探针 P 和 Cu^{2+} 的结合比。Job 工作曲线结果进一步表明荧光多肽探针 P 和 Cu^{2+} 以 2:1 的比例结合。

图 2 在 pH 7.4 的 HEPES 缓冲溶液中, 不同浓度的 Cu^{2+} 对荧光多肽探针 P 的荧光淬灭产生一系列荧光发射光谱图(a)和在最大荧光发射波长处, 荧光多肽探针的荧光强度与 Cu^{2+} 浓度相关曲线图(b) (网络版彩图)

Figure 2 (a) The fluorescence quenching spectra were recorded for the probe peptide P in the presence of various concentrations of Cu^{2+} , and (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 (color online).

3.3.3 理论模拟计算

通过理论计算进一步研究荧光多肽探针 P 与 Cu^{2+} 的结合比。图 4(a) 为优化后的荧光多肽探针 P 的构型, 图 4(b) 显示 Cu^{2+} 通过与荧光多肽探针 P 中 His 上的 N 原子和 Glu 上的 O 原子进行配位, 结果表明荧光多肽探针 P 与 Cu^{2+} 以 2:1 的比例进行结合。理论计算显示荧光多肽探针 P 本身的最小总能量为 75.107 kcal/mol, 2P-Cu 配合物的总能量为 169.098 kcal/mol, 表明此过程是非自发进行的。理论模拟结果进一步说明荧光多肽探针 P 与 Cu^{2+} 是以 2:1 的结合比形成了配合物。

图3 在20 mmol/L pH 7.4的HEPES缓冲溶液中, 荧光多肽探针P与 Cu^{2+} 的Job工作曲线图

Figure 3 A Job's plot for the probe peptide P with Cu^{2+} in 20 mmol/L HEPES at pH 7.4.

图4 荧光多肽探针P (a)与2P-Cu (b)的最低能量结构图(网络版彩图)

Figure 4 The energy minimized structures for the probe peptide P (a) and 2P-Cu (b) (color online).

3.4 2P-Cu生物传感器对 S^{2-} 的荧光响应

为了证明利用2P-Cu生物传感器可以高特异性地识别 S^{2-} , 本文测定了其他阴离子(2: F^- 、3: Cl^- 、4: Br^- 、5: I^- 、6: HPO_4^{2-} 、7: H_2PO_4^- 、8: Ac^- 、9: ClO_4^- 、10: NO_3^- 、11: CO_3^{2-} 、12: HCO_3^- 、13: NO_2^- 、14: PO_4^{3-} 、15: SO_4^{2-} 、16: SO_3^- 、17: CNS^- 、18: $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$)存在(黑色)时, 2P-Cu生物传感器的荧光强度. 与 S^{2-} (图5(a))相比, 其他阴离子对2P-Cu生物传感器的荧光恢复很弱, 表明2P-Cu生物传感器对 S^{2-} 具有高特异性(图5(b)). 此外, 我们还研究了其他阴离子存在(红色)时, S^{2-} 对2P-Cu生物传感器荧光恢复能力的影响. 与 S^{2-} 单

图5 (a) 在pH 7.4的HEPES缓冲溶液中, S^{2-} 对2P-Cu生物传感器的荧光恢复光谱图和(b) S^{2-} 存在(红色)与不存在(黑色)时, 其他17种阴离子对2P-Cu生物传感器的干扰柱状图(网络版彩图)

Figure 5 (a) The fluorescence restoration spectra were recorded for the 2P-Cu biosensor alone (red) and the biosensor complexed with S^{2-} , (b) the fluorescence intensities were measured for the 2P-Cu biosensor in the presence of other anions (black) and together with S^{2-} (red) at pH 7.4 (color online).

独存在时相比, 2P-Cu生物传感器与其他阴离子共同存在时显示出相似的荧光恢复能力, 表明其他阴离子不影响2P-Cu生物传感器对 S^{2-} 的检测(图5). 上述结果表明2P-Cu生物传感器能高特异性地检测 S^{2-} , 而不受其他阴离子的干扰.

3.5 2P-Cu生物传感器与 S^{2-} 的相互作用

为了研究 S^{2-} 对2P-Cu生物传感器的荧光恢复情况, 我们检测了不同当量的 S^{2-} 条件下, 荧光多肽探针P的荧光发射光谱图(图6). 从荧光发射光谱图可看出, 随着 S^{2-} 浓度不断增加, 2P-Cu生物传感器的荧光强度不断增加并发生红移现象(图6(a)), 当浓度达到3当量或更高时, 2P-Cu生物传感器的荧光强度不再增加(图6

图 6 在 pH 7.4 的 HEPES 缓冲溶液中, 不同浓度的 S^{2-} 对 2P-Cu 生物传感器的荧光恢复产生一系列荧光发射光谱图(a)和在最大荧光发射波长处, 荧光多肽探针的荧光强度与 S^{2-} 浓度相关曲线图(b) (网络版彩图)

Figure 6 (a) The fluorescence restoration spectra were recorded for the 2P-Cu biosensor in the presence of various concentrations of S^{2-} , (b) the fluorescence intensity monitored at the maximum fluorescence emission wavelength as a function of the concentration of S^{2-} at pH 7.4 (color online).

(b)). 我们猜测, 加入 S^{2-} 时 2P-Cu 生物传感器的荧光强度增加, 可能是由于 S^{2-} 与 2P-Cu 生物传感器中的 Cu^{2+} 结合形成 CuS 沉淀导致荧光多肽探针 P 游离出来。

不同浓度的 S^{2-} 与 2P-Cu 生物传感器荧光强度之间的高度线性相关 ($R^2=0.99$) (图 S2(b)), 说明该 2P-Cu 生物传感器可用于实现 S^{2-} 的定量检测。随着 S^{2-} 的浓度增大, 2P-Cu 生物传感器中的 Cu^{2+} 与 S^{2-} 结合, 荧光多肽探针 P 不断地游离出来, 因此导致荧光强度的增加, 2P-Cu 生物传感器对 S^{2-} 的检测具有较宽的线性范围 (0~1.2 $\mu\text{mol/L}$), 以及较低的检测限 (85 nm) (图 S2(b)). 这些结果证明 2P-Cu 生物传感器可以实现对 S^{2-} 的高灵敏检测。

3.6 细胞成像研究

首先我们研究了荧光多肽探针 P 的细胞毒性。荧光多肽探针 P 在不同浓度下均显示相似的细胞存活率 (图 S3), 即使高浓度的 P 存在, 细胞存活仍然达到 90% 以上, 这表明荧光多肽探针 P 细胞毒性低, 可用于活细胞成像研究。

在 HEPES 缓冲溶液体系中, 荧光多肽探针 P 对 Cu^{2+} 和 S^{2-} 表现出高特异性识别作用。为了研究荧光多肽探针 P 对活细胞的适用性, 本文研究了该探针 P 在活细胞内 Cu^{2+} 和 S^{2-} 的检测。从图 7(a) 中可以看出仅有荧光多肽探针 P 时, HeLa 细胞表现出较强的绿色荧光, 因为 HeLa 细胞自身没有绿色荧光, 所以荧光多肽探针 P 进入 HeLa 细胞, 当加入 Cu^{2+} 后, 绿色荧光被明显淬灭, 表明该荧光多肽探针 P 可以靶向结合细胞中的 Cu^{2+} (图 7(d)), 再继续加入 S^{2-} 后, 荧光多肽探针的荧光被恢复, 表明荧光多肽探针 2P-Cu 体系可以靶向结合细胞中的 S^{2-} (图 7(g)). 这些结果充分表明荧光多肽探针 P 可以用于活细胞中 Cu^{2+} 和 S^{2-} 的成像。

3.7 斑马鱼成像研究

本文继续探索了该荧光多肽探针 P 用于斑马鱼中

图 7 HeLa 细胞的荧光成像实验。向细胞中加入 P 孵育 1 h 的荧光图(a), 明场图(b)和荧光图与明场叠加图(c); 向 P 中加入 Cu^{2+} 孵育 1 h 的荧光图(d), 明场图(e)和荧光图与明场叠加图(f); 向 2P-Cu 中加入 S^{2-} 孵育 1 h 的荧光图(g), 明场图(h)和荧光图与暗场叠加图(i) (网络版彩图)

Figure 7 The fluorescence images of HeLa cells. Fluorescence images of cells after incubation with P (a), P and Cu^{2+} (d), 2P-Cu and S^{2-} (g) for 1 h. The corresponding bright-field images (b, e, h) and merged images (c, f, i) (color online).

Cu^{2+} 和 S^{2-} 的成像。从图8(a)中可以明显看出, 加入荧光多肽探针P孵育后的斑马鱼头部表现出显著的绿色荧光, 当加入 Cu^{2+} 后, 斑马鱼头部的绿色荧光被明显淬灭(图8(d)), 最后再继续加入 S^{2-} 后, 斑马鱼头部的荧光恢复(图8(g))。斑马鱼成像结果表明荧光多肽探针P能够在生物体内实现 Cu^{2+} 和 S^{2-} 的检测。

4 结论

Cu^{2+} 和 S^{2-} 作为人体内重要的两种离子, 其含量被精密调控, 过量的 Cu^{2+} 和 S^{2-} 被发现与阿尔兹海默症等严重疾病息息相关。本文构建的新型六肽荧光探针P具有良好的荧光信号, 可以选择性地结合 Cu^{2+} , 导致Dansyl染料的荧光淬灭, 从而实现对 Cu^{2+} 的高特异性检测。形成的2P-Cu配合物在加入 S^{2-} 后, 多肽探针的荧光显著恢复, 因为 S^{2-} 会结合 Cu^{2+} 形成CuS沉淀, 从而释放出2P-Cu配合物中的多肽探针。新开发的新型荧光多肽探针P通过“On-Off-On”荧光响应模式, 可高灵敏、高特异性地识别 Cu^{2+} 和 S^{2-} , 并成功地用于活细胞和斑马鱼中 Cu^{2+} 和 S^{2-} 的靶向检测。该荧光多肽探针水溶性好、细胞毒

图8 斑马鱼的荧光成像图。(a) 在斑马鱼幼崽中加入P孵育1 h的荧光图; (d) 向斑马鱼幼崽中加入P后再加入 Cu^{2+} 孵育1 h的荧光图; (g) 向斑马鱼幼崽中加入2P-Cu后再加入 S^{2-} 孵育1 h的暗场图; (b, e, h) 对应的明场图; (c, f, i) 对应的荧光图与明场叠加图(网络版彩图)

Figure 8 The fluorescence images of zebrafish larva: fluorescence images of zebrafish larva after incubation with P (a), P and Cu^{2+} (d), 2P-Cu and S^{2-} (g) for 1 h. Fluorescence images (a, d, g) and merged images (c, f, i) of zebrafish larva corresponding to the part bright-field images of zebrafish larva (b, e, h), respectively (color online).

性低, 为细胞和活体中 Cu^{2+} 和 S^{2-} 的靶向成像提供了强有力的工具。

补充材料

本文的补充材料见网络版<http://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 Crisponi G, Nurchi VM, Fanni D, Gerosa C, Nemolato S, Faa G. *Coord Chem Rev*, 2010, 254: 876–889
- 4 Kamoun P. *Amino Acids*, 2004, 26: 243–254
- 5 Dominy JE, Stipanuk MH. *Nutrit Rev*, 2004, 62: 348–353
- 6 Evans CL. *Exp Physiol*, 1967, 52: 231–248
- 7 Eto K, Asada T, Arima K, Makifuchi T, Kimura H. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 293: 1485–1488
- 8 Ramdass A, Sathish V, Babu E, Velayudham M, Thanasekaran P, Rajagopal S. *Coord Chem Rev*, 2017, 343: 278–307
- 9 Chen X, Wang F, Hyun JY, Wei T, Qiang J, Ren X, Shin I, Yoon J. *Chem Soc Rev*, 2016, 45: 2976–3016
- 10 Prodi L, Bolletta F, Montalti M, Zaccheroni N. *Coord Chem Rev*, 2000, 205: 59–83
- 11 Li J, Zeng Y, Hu Q, Yu X, Guo J, Pan Z. *Dalton Trans*, 2012, 41: 3623–3626
- 12 Choi MG, Cha S, Lee H, Jeon HL, Chang SK. *Chem Commun (Camb)*, 2009, 2009: 7390–7392
- 13 Wang P, Wu J, Su P, Xu C, Ge Y, Liu D, Liu W, Tang Y. *Dalton Trans*, 2016, 45: 16246–16254
- 14 Wang P, Liu L, Zhou P, Wu W, Wu J, Liu W, Tang Y. *Biosens Bioelectron*, 2015, 72: 80–86

A novel fluorescent peptide probe for the specific detection of Cu^{2+} and S^{2-} in cells and zebrafish

Yue Hu¹, Siqi Quan¹, Yongxin 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 one of the most abundant trace elements in human body, Cu^{2+} plays an important role in normal physiological activities and metabolism, while excessive Cu^{2+} has been found to be closely related to serious diseases such as Down's syndrome and Alzheimer's disease. As a widespread anion in human body, S^{2-} participates in the regulation of intracellular redox balance, cell apoptosis, insulin secretion and other physiological processes. However, its pronounced accumulation may cause Alzheimer's and Parkinson's disease. Herein, a fluorescent peptide probe P (Dansyl-Asp-Glu-Pro-Gly-Ser-His) was created. The peptide probe can specifically detect Cu^{2+} without the interferences of other ions. The formation of 2P-Cu complex at 2:1 stoichiometry leads to remarkable fluorescence quenching, while the addition of S^{2-} releases the Cu^{2+} from the 2P-Cu complex and recovers its fluorescence. We have demonstrated that the fluorescent peptide probe P provides an "On-Off-On" sensing mode for Cu^{2+} and S^{2-} with the detection limits of 160 and 85 nM, respectively. P has been successfully used for the imaging of Cu^{2+} and S^{2-} in living cell and zebrafish. The newly developed fluorescent peptide probe has extraordinary features such as good biocompatibility, low biotoxicity, and high specificity of Cu^{2+} and S^{2-} , which shows great potential in the studies of various $\text{Cu}^{2+}/\text{S}^{2-}$ -involved diseases.

Keywords: fluorescent peptide probe, Cu^{2+} , S^{2-} , specific detection, zebrafish

doi: [10.1360/SSC-2020-0233](https://doi.org/10.1360/SSC-2020-0233)