

· 专题论坛 ·

点击化学反应在植物细胞标记中的应用

张御格^{1,2}, 袁笑妍^{1,2}, 张贵芳^{1,2}, 李雨健^{1,2}, 殷金环^{1,2}, 林金星^{1,2}, 李晓娟^{1,2*}

¹北京林业大学生物科学与技术学院, 林木、花卉遗传育种教育部重点实验室, 北京 100083

²林木育种与生态修复国家工程研究中心, 北京 100083

摘要 点击化学又称“链接化学”或“速配结合式组合化学”。其可通过碳-杂原子键(C-X-C)连接产生出诸多功能强大、高度可靠且具较强特异性的反应, 是一种快速合成大量化合物的新方法。近几年, 点击化学在药物开发、新材料合成、材料表面功能化修饰和生物大分子标记等方面取得了较大进展。2022年, 点击化学的开拓者获得了诺贝尔化学奖。该文简要介绍点击化学的原理和反应类型, 重点总结其在标记生物大分子上的研究进展, 特别是在植物细胞壁聚糖标记方面的应用, 以期解析植物细胞壁结构、合成和动态转运机制提供新思路。

关键词 点击化学反应, 叠氮-炔烃环加成反应, 细胞壁, 聚糖

张御格, 袁笑妍, 张贵芳, 李雨健, 殷金环, 林金星, 李晓娟 (2023). 点击化学反应在植物细胞标记中的应用. 植物学报 58, 956–965.

生物标记是对生物器官、组织、细胞以及生物大分子进行标记, 进而观察其结构和动态的常用方法。同位素标记、单克隆抗体和荧光蛋白标记是最经典的标记技术。这些标记技术在医学和生命科学等领域的广泛应用极大地促进了相关研究, 但是其也存在一些不足之处。例如, 同位素标记具有灵敏度高、操作简单方便和定位相对准确等优点, 但是放射性同位素具有较高的放射性, 对人体健康有害。稳定性同位素虽然安全无辐射, 但是对检测仪器设备要求较高, 这些缺点极大地限制了同位素标记的应用范围(Beller and Hummon, 2022; Chang et al., 2022)。抗体标记常用于医学病理学、分子生物学以及生物制药等领域的分析研究与技术测定, 但在样品制备过程中通常需要固定样本, 故无法获得活细胞的动态信息, 也存在一定的局限性(Turner et al., 2021)。通过融合基因编码的荧光蛋白标记具有高度特异性以及操作简单等优点(刘玥等, 2015), 但因其本身就是一个大分子, 较大的空间位阻会影响目标蛋白质的结构, 进而影响其功能(杨麦云和陈鹏, 2015; Truong and Ferré-D'Amaré, 2019)。此外, 生物细胞的其它重要组分(如

聚糖和脂类非蛋白质)无法利用遗传编码的荧光标签进行标记, 极大限制了人们对细胞组分及其代谢转运过程的观察与解析。可见, 传统的标记方法在聚糖脂质等生物大分子标记和成像上存在很大挑战。

点击化学(click chemistry)标记是利用细胞自身的生物代谢合成机制, 将生物正交化学报告基团整合到目标生物分子中, 是近年来兴起的一种简单且高效的生物化学标记方法。生物正交化学报告基团是一种非天然的化学官能团, 可特异性地与外源探针反应, 并且不干扰细胞内其它反应发生, 从而对活体生命系统中的生物大分子进行标记。点击化学标记兼具基因编码标签的简单性、抗体标记的特异性以及小分子探针的多功能性优点, 实验操作简单、高效、特异性强、毒害性小, 且几乎不改变被标记对象的构象, 并能高度还原细胞内的生物学过程(Bidhendi et al., 2020)。因此, 点击化学反应在包括生物成像以及药物研发在内的很多领域均得到广泛应用。近年来, 点击化学发展为化学生物学这一新兴交叉领域的核心方向。2022年10月, 其开拓者美国科学家Karl Barry Sharpless、美国斯坦福大学教授Carolyn R. Bertozzi和丹麦哥本

收稿日期: 2022-10-25; 接受日期: 2023-02-28

基金项目: 国家自然科学基金(No.91954202, No.31871349)和北京林业大学科技创新计划(No.2019JQ03003)

* 通讯作者。E-mail: lixj@bjfu.edu.cn

哈根大学教授Morten Meldal荣获诺贝尔化学奖。

植物细胞中有很多独特的结构和生物分子。例如,植物细胞壁是由不同种类的聚糖、糖蛋白和芳香族聚合物紧密联结而成,是植物细胞重要的特征结构,也是自然界最复杂的结构之一(肖银燕等, 2020)。植物细胞壁作为一种高效可再生材料,在生物质能源利用等领域具有广阔的应用前景。因此,对细胞壁这一复杂多变的结构进行深入解析一直是植物细胞生物学研究中的重点与难点(DeVree et al., 2021)。点击化学标记技术的兴起为细胞壁精细结构解析、组成成分区分与物质合成转运可视化提供了有力的技术支持。本文主要综述点击化学反应在生物学中的应用,并对其在植物细胞壁聚糖标记分析中的应用进行重点论述。

1 点击化学反应及其特征

点击化学是由美国化学家Sharpless提出的一种快速合成大量化合物的新方法,是继组合化学(combinatorial chemistry)之后又一项合成方法的重大技术革新(Kolb et al., 2001)。点击化学英文全称为“click chemistry”,其中的“click”源于“click it or ticket”,“click”也因此被比喻成系安全带的搭扣。Click反应是用点击化学的方法将分子片段拼接起来(像将搭扣的两部分“咔哒”扣起来一样简单)。搭扣两边无论连接什么基团,只要搭扣两部分碰在一起,就能互相结合起来。并且搭扣两边的结构决定了它们只能与对方特异性结合(Finn et al., 2008)。国内学者最初将“click”理解为“mouse click”,并翻译为“点击”,即“点击化学”,其实这一翻译并不准确,“链接化学”或“速配结合式化学”的翻译更能体现点击化学反应的简单、高效以及选择性好的优势。

点击化学反应的实质是选用易得的原料,通过可靠、高效且具有选择性的化学反应实现碳-杂原子键(C-X-C)的连接,并借助这些反应来简单高效地获得分子多样性。点击化学反应具备以下特点:原料易得,反应操作简单且无副产物或者副产物为水;绝大部分反应涉及碳-杂原子(主要是氮氧硫)键的形成;产物得率高,选择性好;很多点击化学反应对氧气不敏感且不受水的负面影响,水的存在反而可以起到加速反应的作用(Kolb et al., 2001; Devaraj and Finn, 2021; Rodríguez et al., 2022)。

2 点击化学反应类型

目前,在生物学、药物开发和医用材料等领域的研究中,点击化学反应主要涉及4种反应类型:环加成反应、亲核开环反应、非醇醛的羰基化反应和碳碳多键的加成反应(Takayama et al., 2019)。其中,环加成反应的应用最为广泛,该反应通过连接2种不饱和的反应物形成五元和六元杂环,是对模块化反应融合过程的充分应用。因此,本文主要对环加成反应的类型和发展进行阐述。

1,3-偶极环加成反应是发生在1,3-偶极体与烯烃、炔烃或相应衍生物之间的环加成反应,是最早开发的点击化学反应。其中烯烃类化合物在反应中称为亲偶极体,产物是1个五元杂环化合物,该反应是合成单环及多环化合物的一种重要途径(Gothelf and Jorgensen, 1998)。德国化学家Rolf Huisgen首先应用此类反应获得了五元杂环化合物,故称Huisgen 1,3-偶极环加成反应(Huisgen, 1963)。在非催化反应中,1,3-偶极环加成反应需要高温或者高压催化才能获得合理的反应速率,因此最初的1,3-偶极环加成反应不适合在烧瓶外进行应用(Breugst and Reissig, 2020; Parker and Pratt, 2020)。随后,Rolf Huisgen研究有机叠氮化合物与炔烃之间的反应,发展了铜(I)催化的叠氮-炔烃环化加成反应(copper (I) catalysed azide-alkyne cycloaddition, CuAAC) (Huisgen, 1963)。Bertozzi等(2004)开发出张力促进的叠氮-炔烃环化加成反应(strain-promoted azide-alkyne cycloaddition, SPAAC)。CuAAC和SPAAC反应的原理如图1所示,二者在点击化学中应用最为广泛。

2.1 CuAAC

2002年,Sharpless团队与Meldal团队分别独立报道了铜(I)催化的叠氮-炔烃环加成反应(Rostovtsev et al., 2002)。在铜的催化下,叠氮化物与末端炔烃发生环加成反应生成稳定的1,4-二取代-1,2,3-三唑。在CuAAC反应中,铜(I)显著提高反应的速率,并且使反应能够在室温以及中性水溶剂中顺利完成。应用CuAAC标记生物体内的大分子分为2步。第1步是生物代谢标记。用含有叠氮化物或炔烃官能团的化学报告物孵育样品,利用其能够被生物体代谢吸收的特点,将其特异性靶向整合到目标生物大分子上。第2

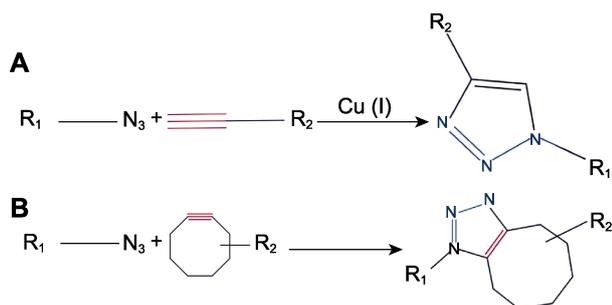


图1 环加成反应的2种反应类型CuAAC (A)和SPAAC (B)

CuAAC采用端基炔烃和叠氮化物在铜离子催化下形成1,4-二取代-1,2,3-三唑; SPAAC利用环辛炔和叠氮化物反应形成稳定的三唑。CuAAC: 铜(I)催化的叠氮-炔烃环化加成反应; SPAAC: 张力促进的叠氮-炔烃环化加成反应

Figure 1 Two types of cycloadditions reactions CuAAC (A) and SPAAC (B)

CuAAC uses end-group alkynes and azides to form 1,4-disubstituted-1,2,3-triazole catalyzed by copper ions; SPAAC uses cyclooctyne and azide reactions to form stable triazoles. CuAAC: Copper (I) catalysed azide-alkyne cycloaddition; SPAAC: Strain-promoted azide-alkyne cycloaddition

步是点击化学标记。引入带有与化学报告物特异性反应的探针(包含荧光团部分), 从而实现对体内被标记的生物分子状态进行实时成像(Prescher and Bertozzi, 2005; Kim and Koo, 2019)。

点击化学中, 涉及CuAAC的“点击”反应是最有价值的反应之一。这种标记方法优于其它标记, 因为叠氮和炔基团在生物系统中极为罕见, 而且这2种官能团对生物分子和水环境基本呈现惰性, 几乎不与生物分子发生反应(Li and Zhang, 2016)。此外, 由于CuAAC不受溶剂的限制, 并且叠氮基团和炔基标签足够小, 容易被引入各种物质结构中, 且对其原有功能不产生干扰, 因此特别适用于生物领域(成波和陈兴, 2020)。另外, 其在有机化学、生物科学(Yoon et al., 2022)、材料科学(Xiong et al., 2021)以及医学药物开发(Takayama et al., 2019)等领域均有广泛应用, 甚至很多研究人员将CuAAC称为“点击化学”。

然而, Cu (I)作为催化剂对细胞有一定的毒性, 致使CuAAC在生物系统中的应用具有挑战性。鉴于CuAAC中使用的Cu (I)容易被氧化为Cu (II), 为维持铜离子的一价状态需要添加还原剂(如抗坏血酸), 但其副产物也会对细胞造成损伤。近年来, 研究人员陆续开发了THPTA、BTAA和BTTP等配体, 这些配体

能保护Cu (I)免受氧化, 同时增强其催化活性并加速反应。这些配体由于具有双正交性、低细胞毒性以及高反应速率等特征, 其广泛应用也进一步促进了CuAAC的应用(Li and Zhang, 2016)。

2.2 SPAAC

1961年, Wittig和Krebs报道了纯环辛炔与叠氮苯可发生像“爆炸”一样的反应, 生成单一产物, 即三唑(Wittig and Krebs, 1961)。在此基础上, Bertozzi团队于2004年开发出张力促进的叠氮-炔烃环化加成反应(SPAAC) (Agard et al., 2004) (图1B), 又称无铜点击化学, 该反应不需要使用金属催化剂、还原剂或稳定配体, 且具有稳定和无毒等优势。SPAAC利用环辛炔(如OCT、BCN、DBCO、DIBO和DIFO)释放的炔形成稳定的三唑, 其反应机理主要是在环炔张力的影响下促使叠氮与环炔快速反应, 采用1,4,5-三取代方式生成1,2,3-三唑环化合物(Jewett and Bertozzi, 2010)。与CuAAC不同, SPAAC环炔炔(主要是环辛炔)取代了传统末端炔基标记(Bird et al., 2021), 解决了必须使用铜作为催化剂的问题, 改善了无铜叠氮化物缓慢的反应动力学。尽管SPAAC的反应速率仍然慢于CuAAC, 但在活细胞中具有良好的生物相容性。因此, 该反应已广泛应用于嵌段聚合物形成、代谢工程、纳米粒子功能化以及寡核苷酸标记等领域。

3 点击化学反应在植物细胞标记中的应用

核酸、蛋白质、聚糖和脂质是动植物细胞中4种基本的生物大分子, 执行各类重要的生命活动。在以往作为最常用标记技术的荧光标记成像中, 荧光蛋白标记也无法对聚糖和脂质这种不直接由mRNA或DNA为编码模板合成的物质(即非模板驱动的物质)进行标记(Cheng et al., 2021), 点击化学的出现则巧妙地解决了这一难题。由于点击化学标记使用含叠氮或者炔基等惰性基团的外源物作为报告物, 几乎不与体内其它物质发生反应。报告物与探针之间的高选择性以及高效反应, 使点击化学标记逐渐成为研究生命体内复杂生物过程的重要工具(吴杰和喻艳华, 2015)。在应用点击化学反应标记植物细胞时, 需先对合成的外源类似物进行毒性测试, 之后对外源类似物进行浓度梯度探究, 并且要控制好铜溶液处理时间, 以免植物体

受到胁迫。

3.1 细胞壁聚糖标记

植物细胞壁是存在于细胞外围的一种坚韧且富有弹性的结构, 不仅承担支撑保护细胞的功能, 而且还影响植物整体的生长发育(刘佩佩等, 2021)。聚糖是细胞壁的重要组分, 其丰度和排布模式与植物细胞的生长和形态发生密切相关, 特别是细胞壁聚糖的定位和动态变化是理解细胞壁结构特性和功能所必需的基本要素(Bidhendi et al., 2020)。目前, 细胞壁聚糖的成像主要依赖于特异性抗体或者使用染料。然而, 由于免疫定位通常需先对样本进行化学固定, 因此无法获得活细胞的动态信息。近年来, 点击化学结合代谢

标记为活细胞中细胞壁标记提供了一种重要方法。聚糖的代谢标记是利用细胞的内源性生物合成机制, 将含有生物正交化学报告基团的单糖或者其它组分类似物并入目标聚糖。当含有外源基团的单糖类似物合成并沉积在细胞壁中时, 新加入的含有叠氮或炔烃基团的外源荧光探针便可与携带生物正交基团的非天然糖通过点击化学反应实现共价偶联, 从而可对目标聚糖进行可视化观察(Ropitiaux et al., 2022)(图2)。表1列举了几种已在模式植物拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中报道的可用于点击化学反应标记的外源糖。

Anderson等(2012)将拟南芥Col-0幼苗在含有岩藻糖类类似物炔基化岩藻糖(FucAl)的培养液中孵育, 将FucAl通过代谢标记整合到拟南芥根中。之后, 在

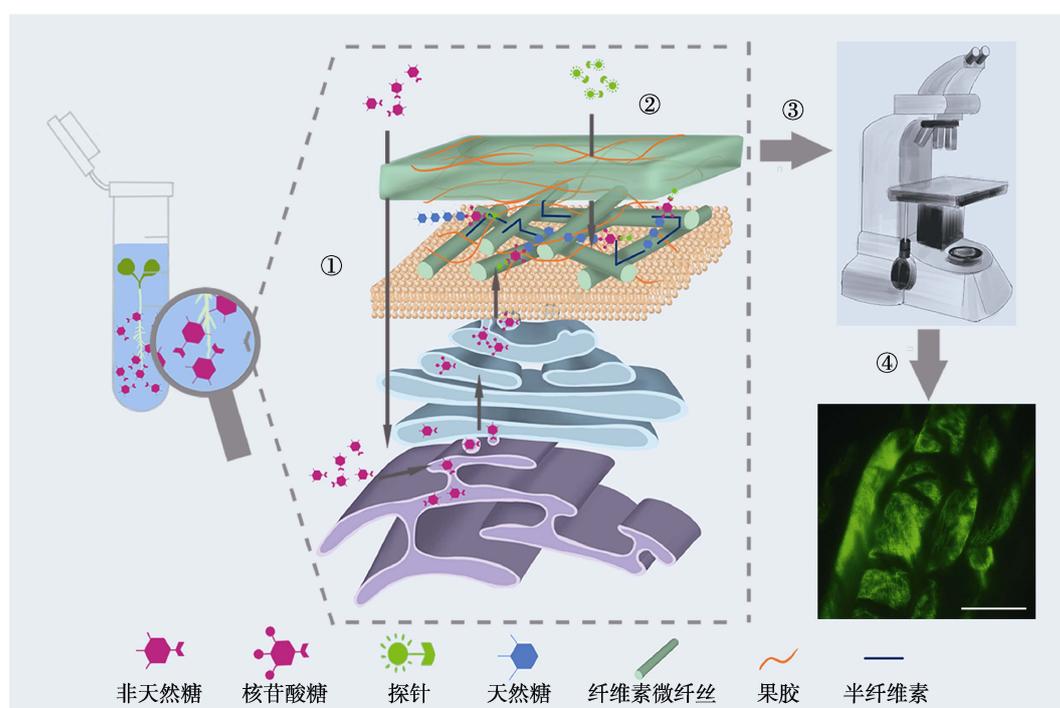


图2 点击化学标记在细胞壁聚糖中应用流程图

图中非天然糖指细胞壁中的单糖组分, 不特指具体糖类。① 外源单糖类类似物通过聚糖合成的补救途径代谢进入细胞; ② 含荧光团的探针与沉积在细胞壁上并含有单糖类类似物的聚糖发生点击反应; ③ 荧光成像检测单糖类类似物在植物体内的排布, 如下方荧光成像图所示植物细胞壁中的果胶RG-II; ④ 荧光显微镜成像点击化学标记的果胶在植物根中的排布(bar=50 μm)。

Figure 2 The flow diagram of applying click chemistry to labeling cell wall glycan

The non-natural sugars in the figure refer to the monosaccharide components in the cell wall, and do not refer to specific sugar molecules. ① Exogenous monosaccharide analogues are metabolized into cells through the remedial glycan synthesis pathway; ② Probes containing fluorophores click with glycans that contain monosaccharide analogues and are deposited on the cell wall; ③ Fluorescence is detected to investigate the arrangement of monosaccharide analogues in plants, as shown in the fluorescent image of pectin RG-II in plant cell wall; ④ Fluorescence microscopy imaging of pectin distribution in plant roots labelled by click chemistry (bar=50 μm).

表1 拟南芥中含有炔基或叠氮官能团的糖类似物**Table 1** Sugar analogues containing alkyne or azide functional groups in *Arabidopsis thaliana*

外源糖	毒害作用	组织定位
炔基化岩藻糖	无毒性	分布于根表皮的细胞壁中
8-叠氮-8-脱氧-3-脱氧-D-甘露-2-辛酮糖酸	无毒性	分布于整个初生壁中,但在质膜附近标记更强
叠氮基N-乙酰氨基葡萄糖	无毒性	根中均有分布,分生区分布较多
叠氮乙酰基阿拉伯糖	无毒性	根中均有分布
叠氮乙酰基岩藻糖	无毒性	根中均有分布
6-脱氧-炔基葡萄糖	抑制根生长	定位于根毛凸起和突出的根毛尖端

铜离子的催化下,使用Alexa Fluor 488-azide或Alexa Fluor 594-azide与FucAI发生点击化学反应。荧光观察结果显示,在经炔基化岩藻糖处理的幼苗中,整个根组织显示出较强的荧光。标记后进行长时间的观察,结果表明含岩藻聚糖的鼠李半乳糖醛酸聚糖I (rhamngalacturonan-I, RG-I)在细胞壁中成均匀分布的点,这些点可能是含有新合成聚糖的囊泡在向细胞壁运输过程中与膜融合的位点。此外,岩藻聚糖在分生区和伸长区的过渡区域以大的点状物排布,在伸长区均匀地弥散在胞内,而在成熟区根毛处显示出强烈的荧光,岩藻聚糖的排布模式沿根的发育梯度有明显差异。利用脉冲追踪实验进一步显示,在伸长区的根表皮细胞中,含有FucAI的岩藻聚糖在细胞伸长过程中沿细胞纵轴重新定向。这些结果揭示了细胞中细胞壁聚糖转运和岩藻糖类似物在不同组织中的分布存在差异,及岩藻糖由散点状到纵向条纹状分布的细胞壁动态相关细节。FucAI的特异性代谢表明,细胞壁单糖的结构变化不影响其被胞内糖基转移酶的无差异结合,为研究单个细胞壁聚糖提供了特异性探针。

植物中,3-脱氧-D-甘露-2-辛酮糖酸(3-deoxy-D-manno-oct-2-ulosonic acid, Kdo)是一种只存在于细胞壁果胶鼠李半乳糖醛酸聚糖II (rhamngalacturonan-II, RG-II)中的单糖。Dumont等(2016)通过CuAAC,用Kdo类似物Kdo-N₃培养拟南芥以及烟草(*Nicotiana tabacum*) BY-2细胞使其进入细胞壁,再用带有炔基官能团的荧光探针与Kdo-N₃发生点击反应,从而实现对细胞壁RG-II的特异性荧光标记。此外,用FucAI和Kdo-N₃同时孵育拟南芥幼苗,分别标记RG-I和RG-II,然后分别用Alexa Fluor 594-azide

和Alexa Fluor 488-alkyne荧光探针进行点击化学反应,对细胞壁进行双重标记。研究表明,新合成的RG-I和RG-II在根细胞壁中以相似分布方式沉积。Kdo-N₃是迄今为止发现的少数几个可被植物细胞同化且特异性极高的叠氮糖,该研究为跟踪细胞内果胶的实时运输及其向质外体传递开辟了新途径。

随着点击化学的广泛应用,研究人员开发了多种可用于点击反应的单糖类似物(Hoogenboom et al., 2016; Wang et al., 2017)。除上述提到的FucAI和Kdo-N₃,还有叠氮单糖类似物叠氮N-乙酰基葡萄糖(Ac4GlcNAz)、叠氮乙酰基阿拉伯糖(Ac3ArabAz)和叠氮乙酰基岩藻糖(Ac4FucAz)。使用非拟南芥细胞糖的类似物N-叠氮乙酰基甘露糖(Ac4ManNAz)与上述几种单糖类似物分别孵育拟南芥,并进行点击标记,成像结果显示,在Ac4ManNAz标记的幼苗中只检测到自发荧光,证实在拟南芥中不含类似物的Ac4ManNAz无法通过代谢进入细胞并发生点击化学反应。同时,该研究表明,Ac4GlcNAz、Ac4FucAz和Ac3ArabAz是由活性代谢介导进入拟南芥根中(Hoogenboom et al., 2016)。此外,北京大学陈兴课题组合成了N-乙酰氨基葡萄糖(N-acetylglucosamine, GlcNAc)、3-脱氧-D-甘露-2-辛酮糖酸、葡萄糖(glucose, Glc)、N-乙酰半乳糖胺(N-acetylgalactosamine, GalNAc)和L-阿拉伯糖(L-arabinose, Arab)的叠氮基或炔基类似物,并对它们在植物糖代谢标记方面进行了系统评估,还对代谢标记和点击反应程序进行优化。在此基础上,研究了非天然糖能否被吸收代谢和上述非天然糖在根尖分布(Zhu et al., 2016; Zhu and Chen, 2017)。然而,并非所有的糖类似物均适用于活细胞研究,有些糖类似物代谢进入细胞后会影响植物的正常生长。例如,以D-葡萄糖为模型合成的6-脱氧炔基葡萄糖(6-deoxy-alkynyl glucose, 6dAG),通过组织代谢特异地进入根毛基部,在根毛区与胼胝体共定位,阻碍根毛和根的生长。这些研究为选择合适的非天然糖探测植物细胞壁结构提供了指导,同时各种非天然糖的合成也为研究植物细胞壁聚糖提供了新工具。

3.2 脂质标记

目前,脂质标记应用最为广泛的是染料标记,但染料标记脂质的特异性较差,特定脂质类标记和可视化成

为细胞生物学领域的一项重大挑战(Paper et al., 2018)。含胆碱的磷脂是细胞膜中最丰富的磷脂, 在细胞代谢和信号转导中起基本结构和调节作用。基于胆碱类似物在磷脂中的代谢结合, Salic团队将天然底物胆碱改性为炔丙基胆碱(propargylcholine, PCho), 通过PCho末端的炔基团与含叠氮探针之间的CuAAC反应, 可在细胞中以高灵敏度和高空间分辨率检测新合成的含炔基的磷脂酰胆碱(phosphatidylcholine, PC)分子, 该方法为研究PC提供了1个“探针”(Jao et al., 2009; Kuerschner and Thiele, 2022)。荧光和免疫成像实验表明, 含炔基标记的PC分子与天然PC的亚细胞定位相互重合, PCho主要定位于高尔基体、内质网、质膜和线粒体(Ancajas et al., 2020)。在此基础上, Paper等(2018)在拟南芥生长培养基中添加了PCho, 发现其很容易被吸收, 且对植物生长无毒害作用。用点击化学反应将PCho中的炔基共价连接上带有荧光标签的叠氮化物Alexa Fluor 594-azide, 从而实现对PC的特异性标记。荧光成像显示, 在拟南芥各个组织中均发现PCho的掺入, 叶表皮中, 保卫细胞的标记信号最强。对植物不同器官脂质组学分析表明, PCho在根中的结合最强, 约50%总胆碱磷脂酯被标记。同时, 在包括种子在内的其它器官中也检测到PCho信号。此外, 磷脂质谱分析表明, 加入PCho对各个组织器官中胆碱和磷脂酰胆碱或其它脂质种类几乎无影响。为进一步探索PCho在细胞内的膜定位, 用GFP或YFP标记的内质网、线粒体、高尔基体和液泡膜作为参照标记物, 用Alexa Fluor 594叠氮化物与PCho进行点击化学反应, 共定位分析表明, PCho可能与细胞器膜(如内质网膜和液泡膜)中的荧光信号分布区域一致。

3.3 蛋白质标记

传统的蛋白质标记方法主要有生物素和荧光基团等, 这类方法应用广泛但普遍存在降低蛋白质活性和对极性变化不敏感等缺点(占方玲等, 2020)。特别是较大的活性蛋白质分析探针, 可能会限制其在生命系统中的应用, 点击化学的出现极大地降低了探针掺入对蛋白质活性的负面影响。

Beatty等(2005)首次报道了CuAAC反应用于标记细菌中新合成的蛋白质。随后, Teramoto团队报道了2种非天然氨基酸(叠氮高丙氨酸(azidohomoalani-

ne, AHA)和高炔丙基甘氨酸(homopropargylglycine, HPG))通过代谢进入细胞内, 在蛋白质合成过程中进入蛋白的一级结构, 并且无明显细胞毒性。特别是炔基氨基酸, 可以很容易地以特异性氨基酸残基的方式并入重组蛋白质中(Teramoto and Kojima, 2015)。例如, HPG在不改变宿主翻译机制的前提下, 作为蛋氨酸(Met)替代物代谢进入蛋白质中形成重组蛋白质(Teramoto and Kojima, 2015; Wang et al., 2017)。通过点击化学反应, 将带有炔基或叠氮化物的探针共价连接在含有AHA或者HPG的目的蛋白上, 再经过亲和素琼脂糖凝珠对目的蛋白纯化富集, 最终可应用于基于凝胶的分析、成像技术或色谱-质谱方法进行后续研究(占方玲等, 2020)。Yao等(2021)利用19种天然氨基酸和HPG处理大肠杆菌(*Escherichia coli*)细胞, 制备含有炔基的重组Bastar蛋白。应用共聚焦荧光显微镜和聚丙烯酰胺凝胶电泳技术均在大肠杆菌中检测到被成功标记的Bastar蛋白。

点击化学标记在蛋白质中的应用为蛋白质组学研究提供了强有力的工具, 然而含有叠氮基或炔基团的非天然氨基酸种类较少, 这限制了点击化学在蛋白质标记中的广泛应用。因此, 开发多种可进行点击反应的小分子类似物是未来点击化学反应研究的一个热点方向。

3.4 核酸标记

点击化学反应应用于核酸标记时, 可特异地研究细胞周期动态、DNA和RNA的合成, 及细胞增殖等重要的细胞生命过程。与传统的化学标记和酶标记技术相比, 应用点击化学标记可有效且经济地标记和连接核酸及环化寡核苷酸(Fantoni et al., 2021)。

Mitchison等(2008)用5-乙炔基-2'-脱氧尿苷(5-ethynyl-2'-deoxyuridine, EdU)通过点击反应实现了DNA标记(Ming et al., 2008; Fantoni et al., 2021)。EdU在单纯疱疹病毒-胸苷激酶(Herpes Simplex Virus-1 thymidine kinase, HSV1-TK)作用下发生磷酸化(Neef et al., 2015), 然后在DNA聚合酶的作用下被引入基因组, 接着在Cu(I)催化下与含叠氮基团的荧光探针偶联实现荧光标记。值得注意的是, 在特异性抑制DNA合成的细胞中未检测到EdU标记, 说明EdU在细胞内仅对DNA的合成具有特异性(Neef and Luedtke, 2014)。该方法标记DNA的优点在于炔基不

产生空间位阻,且无须事先固定样品或使DNA变性(Fantoni et al., 2021)。

通过点击化学反应标记RNA的方法与标记DNA相似,在基因转录过程中带有叠氮或炔烃基团标签的核苷被RNA聚合酶代谢进入RNA。为使核糖核苷5-乙炔基尿苷(5-ethynyl Uridine, EU)代谢整合到RNA中,EU需进入核糖核苷补救途径,即EU磷酸化形成5-磷酸核糖核苷酸——5-乙炔基尿苷一磷酸(5-ethynyl-uridine monophosphate, EUMP)、5-乙炔基尿苷二磷酸(5-ethynyluridine phosphate, EUDP)和5-乙炔基尿苷三磷酸(5-ethynyluridine triphosphate, EUTP)。核糖核苷酸还原酶将核糖核苷二磷酸转化为脱氧核糖核苷二磷酸,成为合成DNA的dNTP。如果EUDP是核糖核苷酸还原酶的底物,将导致生成EdUTP,EdUTP很容易代谢进入DNA中,从而限制EU标记RNA的特异性。为探明EU特异性标记RNA还是非特异性标记RNA和DNA,用核糖核苷酸还原酶抑制剂与EU同时孵育细胞,发现在核糖核苷酸还原酶抑制剂存在的情况下点击标记成像结果与只用EU处理的对照组相比无显著变化。需要指出的是,在脱氧核糖核苷酸抑制剂存在时,EdU代谢进入DNA的过程被RNA还原酶抑制剂消除。表明EU不是核糖核苷酸还原酶抑制剂的底物,同时也证明EU并不标记DNA,EU可以作为RNA的特异性标记物。在对动物体内RNA转录研究中,将EU注射进小鼠(*Mus musculus*)腹腔中进行代谢标记,5小时后将小鼠4种器官(小肠、肾脏、肝脏和脾脏)化学固定进行点击标记,结果显示这4种器官中均有较强的标记,由此可见EU可用作动物体内的RNA标记物(Jao and Salic, 2008)。除EU外,经炔烃修饰的其它核糖核苷酸也可用于标记和追踪细胞中的转录。例如,炔烃修饰的腺苷前体,2-炔基腺苷(2-ethynyl adenosine, EA) (Zou et al., 2019)以及N⁶-丙炔基腺苷(N⁶-propargyl-adenosine, N⁶pA) (Depmeier et al., 2021)可作为RNA代谢的标签。N⁶pA不仅可与荧光标记的叠氮化物发生CuAAC反应,从而进行荧光成像;还可与生物素叠氮化物发生CuAAC反应,使聚腺苷酸化产物带有生物素,进而通过与链霉亲和素偶联对其进行捕获富集。

3.5 其它标记

植物中的木质素也可通过点击化学反应标记进行成

像(Tobimatsu, 2017)。Lion等(2017)报道了应用SPAAC和CuAAC两种类型点击反应的组合同时检测2种不同的单体木质素类似物。他们在亚麻(*Linum usitatissimum*)中使用带有叠氮基团的H型和含炔烃的G型木质素单体类似物,经过代谢独立地整合到亚麻细胞壁后,通过SPAAC和CuAAC分别用带有荧光团的活化环辛炔和叠氮化物基团进行点击反应,从而实现在亚细胞水平和活细胞环境对木质素单体进行双色荧光检测。这种用于研究植物木质化动态学的双重代谢标记法被命名为生物正交标记顺序成像策略(bioorthogonal labeling imaging sequential strategy, BLISS)。这种成像方法与生物化学、细胞生物学和遗传学相结合,有助于揭示与植物细胞壁形成有关的分子机制,并最终实现对细胞壁结构以及组分进行有效且精确的操纵(Zhu et al., 2016)。

4 展望

点击化学的兴起,为药物化学和生物医学成像研究提供了强有力的工具。应用点击化学标记,可在细胞、组织和生物体中实现生物大分子的可视化、追踪和富集。与荧光染料标记相比,点击化学反应标记的特异性与灵敏度显著提升,可对目标分子进行精准标记。与荧光蛋白标记相比,点击化学反应标记不需要通过遗传转化获得标记材料,极大地缩短了研究所耗费的时间。特别是对于难以遗传转化的植物材料,点击化学反应标记为在其中实现特异标记和活体成像提供了可能。在植物中,通过点击化学标记的方法已实现细胞壁组分(如果胶RG-I、RG-II、乙酰基葡萄糖、乙酰基阿拉伯糖和木质素)的标记。应用丙炔基胆碱在植物中对磷脂酰胆碱进行标记,为研究磷脂酰胆碱和其它脂质在植物生长发育中的动态作用提供了新手段。利用点击化学对细胞壁组分和脂质进行标记的研究,为非模板驱动编码的物质提供了一种更加准确且快速的标记方法。虽然目前点击化学反应用于标记植物核酸和蛋白质等生物大分子的研究尚不多见,但是新型点击化学反应的开发及其在动物和微生物中应用的快速发展,将促进其未来在植物细胞中对核酸和蛋白质标记的应用。

目前,利用点击化学对生物大分子进行标记和观察仍存在一些挑战。例如,在标记蛋白质时,被

叠氮或炔烃基团修饰的氨基酸可能会改变蛋白质的构象进而影响其功能; 在核酸标记中, 由于无法控制被修饰的核苷酸在指定的序列进行标记, 使得小分子寡核苷酸标记的实用性受到极大限制。在合成单糖类类似物时, 要在合适的键位进行修饰改造, 以保证修改后的单糖在进行点击化学反应的同时还可与聚糖正确连接。特别是, 植物细胞具有独特的细胞壁结构, 其聚糖由多种类型的单糖组成, 并且每种单糖可能参与多种聚糖的形成, 因此使用单糖类类似物进行标记可能无法特异性标记细胞壁中特定的聚糖。此外, 细胞壁的存在增加了对标记类似物的代谢吸收难度, 限制了代谢标记效率。如果能很好地解决以上问题, 点击化学标记技术在动植物活细胞研究中的应用将会更加广泛。

有机合成化学技术的快速发展将促进更多适合点击化学反应的官能团的设计与开发, 并相应地用于各类样品的活体标记。同时, 对当前已有的点击化学反应官能团进行优化改进便于实现多点击反应同时进行。例如, 可通过研发更高效的配体使2个及以上的点击化学反应之间无须清洗步骤, 从而减少对植物组织的胁迫。随着点击化学技术的不断发展, 特别是与其它学科的深度交叉融合, 其必将在分子生物学、植物细胞生物学和表面修饰等研究领域发挥更大作用。

参考文献

- 成波, 陈兴 (2020). 唾液酸化聚糖的化学标记和解析. *科学通报* **65**, 2984–2997.
- 刘佩佩, 张耿, 李晓娟 (2021). 植物果胶的生物合成与功能. *植物学报* **56**, 191–200.
- 刘玥, 尹悦佳, 梁重阳, 黄殿帅, 王阳, 刘艳芝, 窦瑶, 冯树丹, 郝东云 (2015). 3D-SIM结构照明超分辨率显微镜实现蛋白质在植物亚细胞器内的定位. *植物学报* **50**, 495–503.
- 肖银燕, 袁伟娜, 刘静, 孟建, 盛奇明, 谭烨欢, 徐春香 (2020). 木葡聚糖及其在植物抗逆过程中的功能研究进展. *植物学报* **55**, 777–787.
- 杨麦云, 陈鹏 (2015). 生物正交标记反应研究进展. *化学学报* **73**, 783–792.
- 占方玲, 高思宇, 谢元栋, 张金铭, 李毅, 刘宁 (2020). 点击化学反应在蛋白质组学分析中的研究进展. *分析化学* **48**, 431–438.

- Finn MG, Kolb HC, Fokin VV, Sharpless KB (张欣豪, 吴云东译) (2008). 点击化学——释义与目标. *化学进展* **20**, 1–4.
- Agard NJ, Prescher JA, Bertozzi CR (2004). A strain-promoted [3+2] azide-alkyne cycloaddition for covalent modification of biomolecules in living systems. *J Am Chem Soc* **126**, 15046–15047.
- Ancajas CF, Ricks TJ, Best MD (2020). Metabolic labeling of glycerophospholipids via clickable analogs derivatized at the lipid headgroup. *Chem Phys Lipids* **232**, 104971.
- Anderson CT, Wallace IS, Somerville CR (2012). Metabolic click-labeling with a fucose analog reveals pectin delivery, architecture, and dynamics in *Arabidopsis* cell walls. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**, 1329–1334.
- Beatty KE, Xie F, Wang Q, Tirrell DA (2005). Selective dye-labeling of newly synthesized proteins in bacterial cells. *J Am Chem Soc* **127**, 14150–14151.
- Beller NC, Hummon AB (2022). Advances in stable isotope labeling: dynamic labeling for spatial and temporal proteomic analysis. *Mol Omics* **18**, 579–590.
- Bidhendi AJ, Chebli Y, Geitmann A (2020). Fluorescence visualization of cellulose and pectin in the primary plant cell wall. *J Microsc* **278**, 164–181.
- Bird RE, Lemmel SA, Yu X, Zhou QA (2021). Bioorthogonal chemistry and its applications. *Bioconjug Chem* **32**, 2457–2479.
- Breugst M, Reissig HU (2020). The Huisgen reaction: milestones of the 1,3-dipolar cycloaddition. *Angew Chem Int Ed Engl* **59**, 12293–12307.
- Chang XL, Chen LY, Liu BN, Yang ST, Wang HF, Cao AN, Chen CY (2022). Stable isotope labeling of nanomaterials for biosafety evaluation and drug development. *Chin Chem Lett* **33**, 3303–3314.
- Cheng B, Tang Q, Zhang C, Chen X (2021). Glycan labeling and analysis in cells and *in vivo*. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)* **14**, 363–387.
- Depmeier H, Hoffmann E, Bornewasser L, Kath-Schorr S (2021). Strategies for covalent labeling of long RNAs. *Chem-biochem* **22**, 2826–2847.
- Devaraj NK, Finn MG (2021). Introduction: click chemistry. *Chem Rev* **121**, 6697–6698.
- Devree BT, Steiner LM, Glazowska S, Ruhnnow F, Herburger K, Persson S, Mravec J (2021). Current and future advances in fluorescence-based visualization of plant cell wall components and cell wall biosynthetic machineries. *Biotechnol Biofuels* **14**, 78.
- Dumont M, Lehner A, Vauzeilles B, Malassis J, Marchant A, Smyth K, Linclau B, Baron A, Mas Pons J, Ander-

- son CT, Schapman D, Galas L, Mollet JC, Lerouge P (2016). Plant cell wall imaging by metabolic click-mediated labeling of rhamnogalacturonan II using azido 3-deoxy-D-manno-oct-2-ulosonic acid. *Plant J* **85**, 437–447.
- Fantoni NZ, El-Sagheer AH, Brown T (2021). A hitchhiker's guide to click-chemistry with nucleic acids. *Chem Rev* **121**, 7122–7154.
- Gothelf KV, Jørgensen KA (1998). Asymmetric 1,3-dipolar cycloaddition reactions. *Chem Rev* **98**, 863–910.
- Hoogenboom J, Berghuis N, Cramer D, Geurts R, Zuilhof H, Wennekes T (2016). Direct imaging of glycans in *Arabidopsis* roots via click labeling of metabolically incorporated azido-monosaccharides. *BMC Plant Biol* **16**, 220.
- Huisgen R (1963). 1,3-dipolar cycloadditions. Past and future. *Angew Chem Int Ed Engl* **2**, 565–598.
- Jao CY, Roth M, Welti R, Salic A (2009). Metabolic labeling and direct imaging of choline phospholipids *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**, 15332–15337.
- Jao CY, Salic A (2008). Exploring RNA transcription and turnover *in vivo* by using click chemistry. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**, 15779–15784.
- John CJ, Carolyn RB (2010). Cu-free click cycloaddition reactions in chemical biology. *Chem Soc Rev* **39**, 1272–1279.
- Kim E, Koo H (2019). Biomedical applications of copper-free click chemistry: *in vitro*, *in vivo*, and *ex vivo*. *Chem Sci* **10**, 7835–7851.
- Kolb HC, Finn MG, Sharpless KB (2001). Click chemistry: diverse chemical function from a few good reactions. *Angew Chem Int Ed Engl* **40**, 2004–2021.
- Kuerschner L, Thiele C (2022). Tracing lipid metabolism by alkyne lipids and mass spectrometry: the state of the art. *Front Mol Biosci* **9**, 880559.
- Li L, Zhang ZY (2016). Development and applications of the copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC) as a bioorthogonal reaction. *Molecules* **21**, 1393.
- Lion C, Simon C, Huss B, Blervacq AS, Tirot L, Toybou D, Spriet C, Slomianny C, Guerardel Y, Hawkins S, Biot C (2017). BLISS: a bioorthogonal dual-labeling strategy to unravel lignification dynamics in plants. *Cell Chem Biol* **24**, 326–338.
- Ming X, Leonard P, Heindl D, Seela F (2008). Azide-alkyne "click" reaction performed on oligonucleotides with the universal nucleoside 7-octadiynyl-7-deaza-2'-deoxyinosine. *Nucleic Acids Symp Ser* **52**, 471–472.
- Neef AB, Luedtke NW (2014). An azide-modified nucleoside for metabolic labeling of DNA. *Chembiochem* **15**, 789–793.
- Neef AB, Pernot L, Schreier VN, Scapozza L, Luedtke NW (2015). A bioorthogonal chemical reporter of viral infection. *Angew Chem Int Ed Engl* **54**, 7911–7914.
- Paper JM, Mukherjee T, Schrick K (2018). Bioorthogonal click chemistry for fluorescence imaging of choline phospholipids in plants. *Plant Methods* **14**, 31.
- Parker CG, Pratt MR (2020). Click chemistry in proteomic investigations. *Cell* **180**, 605–632.
- Prescher JA, Bertozzi CR (2005). Chemistry in living systems. *Nat Chem Biol* **1**, 13–21.
- Rodríguez DF, Moglie Y, Ramírez-Sarmiento CA, Singh SK, Dua K, Zacconi FC (2022). Bio-click chemistry: a bridge between biocatalysis and click chemistry. *RSC Adv* **12**, 1932–1949.
- Ropitiaux M, Hays Q, Baron A, Fourmois L, Boulogne I, Vauzeilles B, Lerouge P, Mollet JC, Lehner A (2022). Dynamic imaging of cell wall polysaccharides by metabolic click-mediated labeling of pectins in living elongating cells. *Plant J* **110**, 916–924.
- Rostovtsev VV, Green LG, Fokin VV, Sharpless KB (2002). A stepwise Huisgen cycloaddition process: copper (I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes. *Angew Chem Int Ed Engl* **41**, 2596–2599.
- Takayama Y, Kusamori K, Nishikawa M (2019). Click chemistry as a tool for cell engineering and drug delivery. *Molecules* **24**, 172.
- Teramoto H, Kojima K (2015). Incorporation of methionine analogues into *Bombyx mori* silk fibroin for click modifications. *Macromol Biosci* **15**, 719–727.
- Tobimatsu Y (2017). A "double click" for illuminating plant cell walls. *Cell Chem Biol* **24**, 246–247.
- Truong L, Ferré-D'Amaré AR (2019). From fluorescent proteins to fluorogenic RNAs: tools for imaging cellular macromolecules. *Protein Sci* **28**, 1374–1386.
- Turner MA, Lwin TM, Amirfakhri S, Nishino H, Hoffman RM, Yazaki PJ, Bouvet M (2021). The use of fluorescent anti-CEA antibodies to label, resect and treat cancers: a review. *Biomolecules* **11**, 1819.
- Wang JG, Zhang JB, Lee YM, Ng S, Shi Y, Hua ZC, Lin QS, Shen HM (2017). Nonradioactive quantification of autophagic protein degradation with L-azidohomoalanine labeling. *Nat Protoc* **12**, 279–288.
- Wittig G, Krebs A (1961). Zur existenz niedergliedriger cycloalkine, 1. *Chem Ber* **94**, 3260–3275.
- Wu J, Yu YH (2015). Recent progress on application of

"click" chemistry in labeling of biomolecules. *J Jiangnan Univ (Nat Sci Ed)* **43**, 138–145.

Xiong HT, Zou HY, Liu H, Wang M, Duan LL (2021). Surface functionalization of a γ -graphyne-like carbon material via click chemistry. *Chem Asian J* **16**, 922–925.

Yao TT, Xu XW, Huang R (2021). Recent advances about the applications of click reaction in chemical proteomics. *Molecules* **26**, 5368.

Yoon HY, Lee D, Lim DK, Koo H, Kim K (2022). Copper-free click chemistry: applications in drug delivery, cell tracking, and tissue engineering. *Adv Mater* **34**, 2107192.

Zhu YT, Chen X (2017). Expanding the scope of metabolic glycan labeling in *Arabidopsis thaliana*. *Chembiochem* **18**, 1286–1296.

Zhu YT, Wu J, Chen X (2016). Metabolic labeling and imaging of N-linked glycans in *Arabidopsis thaliana*. *Angew Chem Int Ed Engl* **55**, 9301–9305.

Zou J, Dong XY, Li YL, Tong SQ, Wang JW, Liao MX, Huang GF (2019). Deep sequencing identification of differentially expressed miRNAs in the spinal cord of resniferin-toxin-treated rats in response to electroacupuncture. *Neurotox Res* **36**, 387–395.

The Application of Click Chemistry Reactions in Plant Cell Labeling

Yuge Zhang^{1,2}, Xiaoyan Yuan^{1,2}, Guifang Zhang^{1,2}, Yujian Li^{1,2}, Jinhuan Yin^{1,2}
Jinxing Lin^{1,2}, Xiaojuan Li^{1,2*}

¹Key Laboratory of Genetics and Breeding in Forest Trees and Ornamental Plants, Ministry of Education, College of Biological Sciences and Technology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China; ²National Engineering Research Center of Tree Breeding and Ecological Restoration, Beijing 100083, China

Abstract Click chemistry, also known as "link chemistry" or "speed-matching combinatorial chemistry", is the development of a powerful, highly reliable, and highly specific set of reactions for the rapid synthesis of new compounds through the connection of carbon-heteroatomic bonds (C-X-C). Click chemistry has been progressing greatly in drug development, new material synthesis, material surface functionalization modification and biological macromolecular labeling. Pioneers of click chemistry was awarded the Nobel Prize in Chemistry in 2022. This review briefly introduces the principles, reaction types and applications of click chemistry, summarizes the research progress of click chemistry in labeling biological macromolecules, especially in its application to plant cell wall polysaccharide labeling, and provides new ideas for the study of plant cell wall synthesis, structure and dynamic transport.

Key words click chemistry reaction, azide-alkyne cycloaddition, cell wall, glycan

Zhang YG, Yuan XY, Zhang GF, Li YJ, Yin JH, Lin JX, Li XJ (2023). The application of click chemistry reactions in plant cell labeling. *Chin Bull Bot* **58**, 956–965.

* Author for correspondence. E-mail: lixj@bjfu.edu.cn