



青霉素G酰化酶的近红外荧光探针及其活体成像

贺新元[†], 张昊琳[†], 李晓花^{*}, 史文, 马会民^{*}

中国科学院化学研究所, 活体分析化学重点实验室, 北京分子科学国家实验室, 北京 100190

[†]同等贡献

^{*}通讯作者, E-mail: lixh@iccas.ac.cn; mahm@iccas.ac.cn

收稿日期: 2017-03-10; 接受日期: 2017-05-17; 网络版发表日期: 2017-07-14

国家自然科学基金(编号: 91432101, 21621062)、国家重大科学研究计划(编号: 2015CB932001)和北京分子科学国家实验室开放课题资助项目

摘要 青霉素G酰化酶(PGA)是一种酰胺键水解酶, 是半合成青霉素工业化生产中重要的催化剂. 基于PGA能选择性水解苯乙酸衍生物的性质, 设计合成了一种以氨基半菁为荧光母体、苯乙酰基为识别单元的新型PGA近红外荧光探针. 该探针与PGA反应20 min后, 在705 nm处产生明显的荧光发射, 荧光强度较探针本身增强了82倍. 该荧光响应还呈现出良好的线性范围和很低的检测限. 借助多功能活体成像系统, 该探针已初步用于小鼠中PGA的活性检测, 并在生物样品中PGA的检测方面具有很大的潜力.

关键词 青霉素G酰化酶, 近红外荧光探针, 活体成像, 氨基半菁

1 引言

青霉素G酰化酶(PGA, E.C. 3.5.1.11)是一种酰胺键水解酶, 在工业上广泛用于水解青霉素G制备6-氨基青霉烷酸, 且在新一代抗细菌耐药性青霉素类抗生素的合成中发挥着至关重要的作用^[1-3]. 近期研究表明, PGA可以特异性地水解含苯乙酰结构的酰胺和酯类化合物, 从而能够催化胺、多肽和醇的生成反应^[4,5]. 此外, 由于PGA还能够分解 β -内酰胺类抗生素的 β -内酰胺环, 促使 β -内酰胺抗生素失活, 因此也被广泛用于环境中残留青霉素的清除. 遗憾的是, 有不良商家却将PGA的这种性能用于牛奶中青霉素的清除, 从而对人的健康造成了严重的隐患. 因此, 发展简便、快速、灵敏的PGA检测方法, 以及能够跟踪生物体内PGA的成像分析方法, 则十分必要且具有重要的实际意义.

荧光探针是指能与目标物质发生特异性反应并引起荧光性质的变化, 从而可对目标物质进行分析与测定的一类特殊试剂^[6,7]. 由于荧光分析方法具有选择性好、时空分辨率高及操作简便等优点, 一直以来都备受关注^[8-11]. 近红外荧光探针(分析波长大于650 nm)具有组织穿透力强、生物背景低以及对生物样品的光损伤小等优点, 在生物样品分析中具有独特的优势^[12-17]. 因此, 发展性能优良的PGA荧光探针, 则是实现PGA在生物体内检测的关键. 对此, 虽然人们做了一些努力^[18-21], 但是到目前为止尚未见到PGA近红外荧光探针的报道.

氨基半菁是一种性能优良的近红外荧光母体, 其结构特点是具有可修饰的活性氨基单元, 重要的是, 类似于含羟基的荧光体(如resorufin等), 其羟基取代可致荧光猝灭^[6,22], 氨基半菁荧光体的氨基修饰(如酰胺

引用格式: 贺新元, 张昊琳, 李晓花, 史文, 马会民. 青霉素G酰化酶的近红外荧光探针及其活体成像. 中国科学: 化学, 2017, 47: 994-999
He X, Zhang H, Li X, Shi W, Ma H. *In vivo* imaging of penicillin G acylase in mice via a near-infrared fluorescent probe. *Sci Sin Chim*, 2017, 47: 994-999, doi: [10.1360/N032017-00045](https://doi.org/10.1360/N032017-00045)

键的形成)也可导致荧光猝灭,调控其荧光性能^[23-25]. 本研究以氨基半菁为荧光母体,苯乙酰结构为识别单元,构建了一个打开型的PGA近红外荧光探针(HCAP).该探针本身荧光背景很低,与PGA反应后在705 nm处产生明显的荧光打开信号,荧光增强了82倍,非常适用于PGA的高灵敏检测.进一步地借助多功能活体成像系统,实现了小鼠体内PGA的实时成像.

2 实验部分

2.1 试剂与仪器

IR-780碘化物、PGA、丙氨酸氨肽酶(APN)、焦谷氨酸氨肽酶(PGP-1)、亮氨酸氨肽酶(LAP)、 γ -谷氨酸转氨酶(GGT)购买于默克集团(德国). 3-硝基苯酚、氯化亚硒、苯乙酰氯购于伊诺凯科技有限公司(中国). 磷酸盐缓冲溶液(PBS; 155 mmol/L NaCl, 2.97 mmol/L Na_2HPO_4 , 1.05 mmol/L KH_2PO_4 ; pH 7.4)购于赛默飞世尔(美国). 实验中所用的溶剂和其他试剂都是国产的分析纯试剂. 实验用水均为超纯水(18 M Ω ·cm).

荧光光谱由日立F-4600荧光光谱仪(日本)记录. 紫外-可见光谱用TU-1900分光光度计(普析通用, 中国)记录. 核磁共振谱(^1H NMR和 ^{13}C NMR)在布鲁克DMX-300/400核磁仪(德国)上采集. 电喷雾质谱由岛津LC-MS 2010A质谱仪(日本)测定. 高分辨电喷雾离子化质谱由布鲁克APEX IV FTMS质谱仪(德国)测定. 活体荧光成像由柯达多功能活体成像系统采集(美国). 数据用Origin软件包处理.

2.2 HCAP的合成

氨基半菁荧光母体依照本课题组之前报道的文献合成与提纯^[25].

向氨基半菁(HCA, 42.2 mg, 0.1 mmol)的5 mL二氯甲烷溶液中加入碳酸氢钠(84 mg, 1 mmol),在冰浴中反应10 min. 随后将苯乙酰氯(155 mg, 1 mmol)溶解于2 mL二氯甲烷中,逐滴加入上述反应液,在室温下继续搅拌反应2 h. 将溶剂旋转蒸干,所得残余固体采用柱层析分离(淋洗剂为二氯甲烷:甲醇, 20:1)纯化得产品HCAP约24 mg,产率为45% (图1). ^1H NMR (400 MHz, 298 K, CD_3OD): δ 8.80~8.76 (d, 1H, $J=14.8$ Hz), 8.14 (s, 1H), 7.67~7.65 (d, 1H, $J=7.2$ Hz), 7.58~7.52 (m, 2H), 7.48~7.44 (m, 2H), 7.39~7.35 (m, 5H), 7.30~7.28 (d, 2H, $J=8.4$ Hz), 6.58~6.54 (d, 2H, $J=15.2$ Hz), 4.37~4.33 (t,

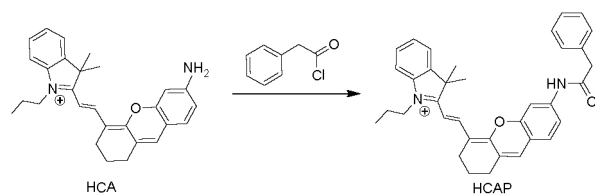


图1 HCAP的合成路线

2H, $J=7.2$ Hz), 3.76 (s, 2H), 2.80~2.77 (t, 2H, $J=6$ Hz), 2.73~2.70 (t, 2H, $J=6$ Hz), 1.98~1.93 (m, 4H), 1.82 (s, 6H), 1.10~1.06 (t, 3H, $J=7.2$ Hz). ^{13}C NMR (75 MHz, 298 K, CD_3OD): δ 178.3, 171.4, 161.3, 153.3, 146.0, 142.3, 142.2, 141.6, 135.0, 132.8, 128.9, 128.6, 128.3, 127.9, 127.2, 126.7, 122.5, 118.0, 116.6, 114.3, 112.7, 105.6, 104.0, 50.8, 46.3, 43.4, 28.7, 26.9, 23.6, 20.9, 20.2, 10.1. HR-ESI-MS: m/z calcd. for HCAP ($\text{C}_{36}\text{H}_{37}\text{N}_2\text{O}_2^+$, M^+), 529.28495; found 529.28504.

2.3 HCAP光谱性质的测定

用二甲基亚砜(DMSO)配制1 mmol/L的HCAP探针母液备用. 在5 mL的离心管中,加入4 mL PBS和25 μL 上述探针母液混匀. 加入PGA酶溶液后,用PBS定容至5 mL. 在摇床中37 $^\circ\text{C}$ 条件下孵育30 min后,对溶液进行荧光光谱和吸收光谱的测定. 同时,在相同条件下测定不加PGA酶溶液样品的光谱作为对照组.

2.4 HCAP的细胞毒性实验

参照已报道的3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)分析方法评价HCAP对于人肝癌细胞(HepG2)的毒性^[9].

2.5 HCAP用于小鼠中PGA的成像

本实验中使用的是BALB/c裸鼠(雌性, 5~6周大),探针、PBS和PGA溶液均采用腹腔注射的方式给药,具体部位为右侧腹腔. 在活体成像实验中,使用的是650 nm的激发滤光片和700 nm的发射滤光片,并考察了小鼠在注射PGA和HCAP后分别反应0、30、45、60 min的荧光成像行为. 本实验中所有动物操作都符合动物福利机构伦理委员会法规和准则.

3 结果与讨论

3.1 探针HCAP对PGA的光学响应

通过比较HCAP与PGA反应前后的光谱变化,我

们研究了探针对PGA的光学响应. 从图2中可以看出, 探针HCAP的最大吸收峰在600 nm处, 并且溶液是没有荧光的. 与PGA反应后, 溶液吸收光谱中的最大吸收峰红移至670 nm处, 同时在705 nm处产生了明显的荧光峰. 这是由于对HCAP结构中氨基的修饰阻碍了荧光分子内的电子转移过程, 从而导致荧光猝灭. 而当酰胺键被水解后, 供电子的氨基基团被重新释放, 体系的荧光得以恢复, 据此认为, PGA对HCAP的苯乙酰基进行了识别及水解反应. 此外, 在这一过程中, 反应体系的荧光强度增加了82倍, 这非常有利于PGA的高灵敏检测.

3.2 反应条件的优化及线性范围

在对探针HCAP与PGA反应条件的考察中(图3)发现, 当温度在25~42℃、pH在4.0~9.1的范围内变化时, 探针本身的荧光信号都很弱, 且在37℃下反应30 min

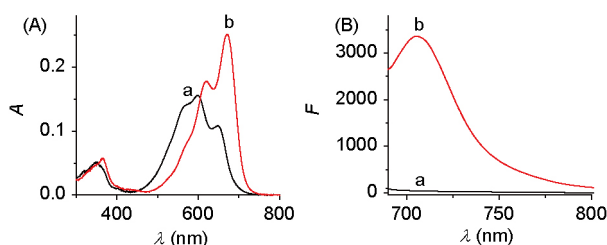


图2 探针HCAP与PGA (20 U/L)反应前(a)、后(b)的吸收(A)和荧光光谱图(B), $\lambda_{\text{ex}}=670$ nm (网络版彩图)

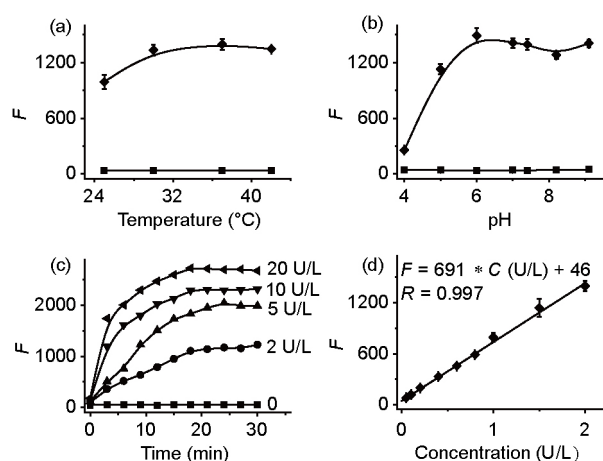


图3 反应条件研究与标准曲线. 在不同温度(a)和pH(b)条件下HCAP与PGA反应前(■)及反应后(◆)的荧光变化; (c) 在37℃和pH 7.4条件下, HCAP与PGA反应的荧光强度-时间曲线图; (d) 标准曲线. $\lambda_{\text{ex/em}}=670/705$ nm

(图3(c))后溶液也没有明显的荧光增强现象, 这表明HCAP具有很好的稳定性. 而且还发现, 在30~42℃、pH 6.0~9.1的反应条件下, HCAP与PGA的反应液的荧光强度没有明显差异(误差<10%), 从而说明探针具有很好的抗干扰能力, 且能够用于生理条件下PGA的检测. 此外, 从HCAP与PGA反应的时间曲线(图3(c))中可以看出, 反应体系的荧光强度的增强在20 min后已达到平台. 因此, 最终选择生理条件(37℃、pH 7.4), 反应时间为20 min作为后续测试的反应条件.

在优化的反应条件下, 我们也研究了HCAP对PGA的线性响应范围. 从图3(d)中可以看出, 在PGA浓度为0.05~2 U/L时, 荧光强度与PGA的浓度之间呈现良好的线性关系, 线性方程为 $F=691 \times C(\text{U/L})+46$ ($R=0.997$). 并且, 对浓度为0.05 U/L的PGA, 重复测量3次的相对标准偏差为2.3%, 检测限低至0.01 U/L, 适合PGA的高灵敏检出.

3.3 反应机理的研究

当HCAP与PGA反应后, 反应液的吸收和荧光光谱均与本课题组之前报道的HCA的光谱高度相似^[25]. 为了证明该反应的机理确实是PGA特异性识别、水解HCAP的苯乙酰基结构, 并释放出荧光团HCA, 我们对反应液进行了质谱和高效液相色谱法(HPLC)的分析. 在反应液的质谱表征中, 出现了HCA的特征质谱峰($m/z=411.3$), 并且HPLC(图4(A))中反应液在12.1 min处也出现了新的色谱峰, 该色谱峰的保留时间与HCA一致, 从而证明了反应液中HCA的生成. 进一步, 将PGA的抑制剂(Fe^{3+})^[26]加入到该反应体系中, 此时可以观察到明显的荧光猝灭效果, 并且高浓度的 Fe^{3+} 能更有效地猝灭体系的荧光(图4(B)). 此外, 还考察了不同浓度的 Fe^{3+} 对单独的HCAP或HCA溶液的荧光影响, 结果表明, 荧光均无显著改变(图4(C)). 因此, 说明反应体系荧光增强现象确实是由PGA的活性导致的. 通过测定, 得到HCAP与PGA反应的米氏常数为22 $\mu\text{mol/L}$, 表明HCAP与PGA之间具有很高的结合力.

3.4 HCAP对PGA的选择性

考察与比较了生物体系中常见物质对探针的荧光响应, 包括无机盐(KCl、 CaCl_2 、 MgCl_2 、 ZnCl_2 、 CuSO_4)、生物分子(半胱氨酸、谷胱甘肽、丙氨酸、葡萄糖、维生素C、肌酸酐、尿素)、活性氧物种(NaOCl 、 H_2O_2)和性质相近的不同氨基肽酶(PGP-1、

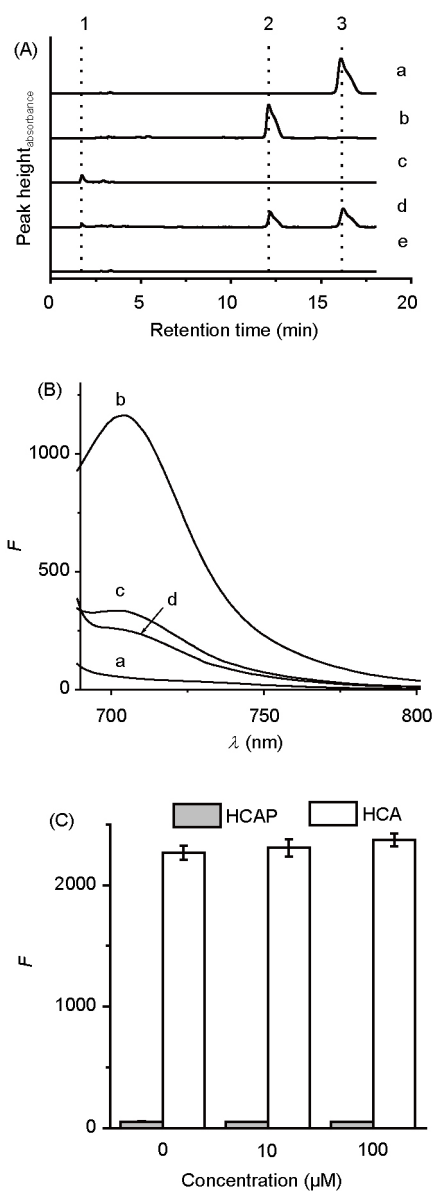


图4 (A) 不同反应体系的HPLC图. (a) HCAP (50 $\mu\text{mol/L}$); (b) HCA (50 $\mu\text{mol/L}$); (c) PGA (50 U/L); (d) HCAP (50 $\mu\text{mol/L}$)+PGA (20 U/L); (e) PBS. (B) 不同反应体系的荧光光谱图. (a) HCAP (5 $\mu\text{mol/L}$); (b) HCAP (5 $\mu\text{mol/L}$)+PGA (2 U/L); (c) (b)+ Fe^{3+} (10 $\mu\text{mol/L}$); (d) (b)+ Fe^{3+} (100 $\mu\text{mol/L}$). (C) 不同浓度的 Fe^{3+} 对HCAP与HCA荧光强度的影响 (pH 7.4 PBS介质). $\lambda_{\text{ex/em}}=670/705 \text{ nm}$

APN、LAP、GGT). 从图5中可以看出, 其他物质的加入并不能引起反应体系荧光的变化, 只有当PGA存在时才会产生明显的荧光增强, 这说明探针HCAP对PGA具有很高的选择性, 且适合PGA的特异性检测.

3.5 HCAP的细胞毒性

采用MTT分析方法, 考察了HCAP对HepG2细胞的毒性. 由图6可以看出, 当探针HCAP浓度不多于10 μM 时, 细胞的成活率均高于85%. 这说明HCAP具有较低的细胞毒性与良好的生物相容性.

3.6 小鼠中PGA的成像

利用所发展的近红外荧光探针HCAP, 以5~6周的BALB/c裸鼠作为模型, 开展了小鼠中PGA的活体成像

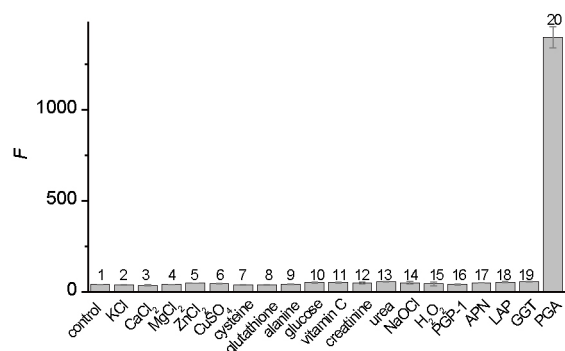


图5 探针HCAP (5 $\mu\text{mol/L}$)在不同物质存在时的荧光强度对比图: (1) control; (2) KCl (150 mmol/L); (3) CaCl_2 (2.5 mmol/L); (4) MgCl_2 (2.5 mmol/L); (5) ZnCl_2 (100 $\mu\text{mol/L}$); (6) CuSO_4 (100 $\mu\text{mol/L}$); (7) 半胱氨酸(cysteine) (1 mmol/L); (8) 谷胱甘肽(glutathione) (1 mmol/L); (9) 丙氨酸(alanine) (100 $\mu\text{mol/L}$); (10) 葡萄糖(glucose) (10 mmol/L); (11) 维生素C (vitamin C) (1 mmol/L); (12) 肌(氨)酸(creatine) (10 mmol/L); (13) urea (20 mmol/L); (14) NaOCl (100 $\mu\text{mol/L}$); (15) H_2O_2 (100 $\mu\text{mol/L}$); (16) PGP-1 (1 $\mu\text{g/L}$); (17) APN (1 $\mu\text{g/L}$); (18) LAP (1 $\mu\text{g/L}$); (19) GGT (10 U/L); (20) PGA (2 U/L). $\lambda_{\text{ex/em}}=670/705 \text{ nm}$

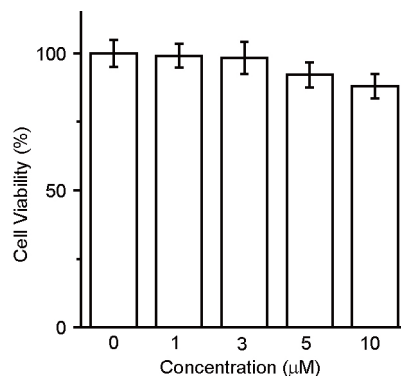


图6 不同浓度的HCAP对HepG2细胞存活率的影响

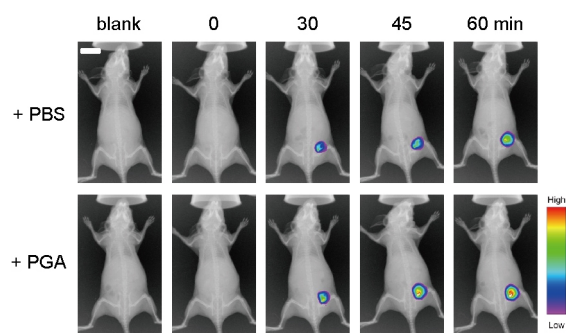


图7 小鼠荧光成像图. 小鼠腹腔注射50 μ L PBS或PGA溶液(100 U/L), 15 min后采集图像(blank); 然后腹腔注射50 μ L HCAP溶液(50 μ mol/L), 不同时间(0、30、45、60 min)后再采集这些小鼠的图像. 标尺: 1 cm (网络版彩图)

研究. 由图7可以看出, 在裸鼠腹腔注射了PBS或PGA酶溶液后, 并没有观察到明显的荧光信号. 而在进一

步注射了HCAP探针溶液后, 裸鼠腹腔部位随着时间的增加逐渐产生了明显的荧光信号, 并且预先注射了PGA酶溶液的裸鼠腹腔部位的荧光信号明显强于相同条件下对照组中注射PBS的荧光信号, 从而初步说明探针HCAP可以用于活体中PGA及其变化的检测.

4 结论

利用PGA对苯乙酰结构的特异性水解反应, 设计合成了一种新的PGA近红外荧光探针HCAP, 该探针对于PGA表现出很高的选择性和灵敏度, 能够用于PGA的荧光分析. 而且, 借助活体成像系统, 该探针还初步用于小鼠中PGA活性变化的荧光成像检测. 该探针具有制备简单, 同时兼具近红外荧光发射的特点. 因此, 这对用于不同体系, 包括活体生物中PGA的荧光成像分析, 以及进一步理解PGA的生物功能具有重要的意义.

参考文献

- Deng S, Ma X, Su E, Wei D. *J Biotech*, 2016, 219: 142–148
- Martínez-Hernández JL, Mata-Gómez MA, Aguilar-González CN, Ilyina A. *Appl Biochem Biotechnol*, 2010, 160: 2045–2053
- Kheirulomoom A, Ardjmand M, Fazelinia H, Zakeri A. *Proc Biochem*, 2001, 36: 1095–1101
- Grundmann P, Fessner WD. *Adv Synth Catal*, 2008, 350: 1729–1735
- Basso A, De Martin L, Ebert C, Gardossi L, Linda P. *J Mol Catal B-Enzym*, 2001, 16: 73–80
- 李照, 马会民. 影像科学与光化学, 2014, 32: 60–68
- Li X, Gao X, Shi W, Ma H. *Chem Rev*, 2014, 114: 590–659
- 尹昊琰, 唐娟, 张俊龙. 中国科学: 化学, 2017, 47: 267–276
- Wan Q, Chen S, Shi W, Li L, Ma H. *Angew Chem Int Ed*, 2014, 53: 10916–10920
- He X, Xu Y, Shi W, Ma H. *Anal Chem*, 2017, 89: 3217–3221
- Chen W, Liu C, Peng B, Zhao Y, Pacheco A, Xian M. *Chem Sci*, 2013, 4: 2892–2896
- Gu KZ, Liu YJ, Guo ZQ, Lian C, Yan CX, Shi P, Tian H, Zhu WH. *ACS Appl Mater Interf*, 2016, 39: 16622–16629
- Lukinavičius G, Reymond L, Umezawa K, Sallin O, D'Este E, Göttfert F, Ta H, Hell SW, Urano Y, Johnsson K. *J Am Chem Soc*, 2016, 138: 9365–9368
- Gong YJ, Zhang XB, Mao GJ, Su L, Meng HM, Tan W, Feng S, Zhang G. *Chem Sci*, 2016, 7: 2275–2285
- Wang X, Cui L, Zhou N, Zhu W, Wang R, Qian X, Xu Y. *Chem Sci*, 2013, 4: 2936–2940
- Wu X, Shao A, Zhu S, Guo Z, Zhu W. *Sci China Chem*, 2016, 59: 62–69
- Wu X, Li L, Shi W, Gong Q, Ma H. *Angew Chem Int Ed*, 2016, 55: 14728–14732
- Richard JA, Massonneau M, Renard PY, Romieu A. *Org Lett*, 2008, 10: 4175–4178
- Chen L, Li J, Du L, Li M. *Med Res Rev*, 2014, 34: 1217–1241
- Ninkovic M, Riester D, Wirsching F, Dietrich R, Schwienhorst A. *Anal Biochem*, 2001, 292: 228–233
- Scheper T, Weiss M, Schügerl K. *Anal Chim Acta*, 1986, 182: 203–206
- Zhang Y, Chen W, Feng D, Shi W, Li X, Ma H. *Analyst*, 2012, 137: 716–721
- Chen H, Dong B, Tang Y, Lin W. *Chem Eur J*, 2015, 21: 11696–11700
- Kong F, Liang Z, Luan D, Liu X, Xu K, Tang B. *Anal Chem*, 2016, 88: 6450–6456
- He X, Li L, Fang Y, Shi W, Li X, Ma H. *Chem Sci*, 2017, 8: 3479–3483
- Zhang Q, Xu H, Zhao J, Zeng R. *Biotechnol Lett*, 2014, 36: 617–625

***In vivo* imaging of penicillin G acylase in mice via a near-infrared fluorescent probe**

Xinyuan He[†], Haolin Zhang[†], Xiaohua Li^{*}, Wen Shi, Huimin Ma^{*}

Beijing National Laboratory for Molecular Sciences, Key Laboratory of Analytical Chemistry for Living Biosystems, Institute of Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China

[†]The authors contributed equally to this work

^{*}Corresponding authors (email: lixh@iccas.ac.cn; mahm@iccas.ac.cn)

Abstract: Penicillin G acylase (PGA) is a hydrolytic enzyme, which is also industrially employed in the preparation of semisynthetic penicillin. Abuse of PGA might occur in milk products to decompose the possible excessive antibiotics. Detection of PGA, including *in vivo* imaging of PGA, is necessary to understand the potential function of this enzyme in living biosystems; however, a near-infrared (NIR) fluorescent probe for PGA is still lacking. On the basis of amino hemicyanine as well as the ability of PGA to hydrolyze phenylacetamide, in this work we have developed a new selective and sensitive NIR fluorescent probe for such a purpose. Combined with *in vivo* fluorescence imaging system, the probe has been preliminarily used to image the change of the PGA activity in mice. In addition, the NIR feature of our probe makes it of potential use in studying the function of PGA *in vivo*.

Keywords: penicillin G acylase, near-infrared fluorescent probe, *in vivo* imaging, amino hemicyanine

doi: [10.1360/N032017-00045](https://doi.org/10.1360/N032017-00045)