



糖动态修饰与生物识别的原位化学探测

胡习乐¹, 贺晓鹏^{1,2*}

1. 华东理工大学化学与分子工程学院, 费林加诺贝尔奖科学家联合研究中心, 结构可控先进功能材料及其制备教育部重点实验室, 上海 200237

2. 中国人民解放军海军军医大学国家肝癌科学中心, “肝癌分子网络调控与靶向干预”教育部重点实验室, 上海市肝胆肿瘤生物学重点实验室, 上海 200438

*通讯作者, E-mail: xphe@ecust.edu.cn

收稿日期: 2023-12-17; 接受日期: 2024-03-12; 网络版发表日期: 2024-03-26

国家自然科学基金(编号: 92253306, 82130099, 21722801, 21572058, 21202045)和上海市科委国际合作项目(编号: 23490711600)资助

摘要 随着人类基因组学与蛋白质组学的蓬勃发展, 人类糖组学解码成为了21世纪至关重要的科学命题. 然而适用于糖组学研究, 尤其是能在活细胞原位精细探测糖生物学信息动态变化的高效、通用化学工具仍相对稀缺. 作者团队长期致力于糖动态修饰(生物分子糖基化与去糖基化)和糖介导生物识别(糖与凝集素或其它生物分子选择性相互作用)的原位示踪, 发展了多种荧光分子探针原型, 实现了上述糖生物学过程的动态探测与免标记高通量筛选. 本文将系统介绍上述可用于糖生物学研究的全新化学技术原理, 及其在凝集素、病毒、细菌以及哺乳动物细胞等不同结构尺度研究模型上的实用范例, 最终提出该类技术方法的后续发展方向.

关键词 化学生物学, 糖组学, 荧光探针, 动态, 原位, 活细胞

1 引言

核酸、蛋白质、糖类、脂类是组成生命体的四类重要生物分子. 其中, 核酸(DNA/RNA)和蛋白质的生物合成是定向、连续、模板化的, 即以一条含有遗传信息的核酸单链为模板, 通过聚合酶、核糖体及其它一系列生物大分子所复合而成的“分子机器”, 定向、有序地完成功能核酸及功能蛋白质的聚合. 然而, 糖类物质的合成是非模板化的. 例如, 细胞表面普遍存在的糖蛋白与糖脂缀合物中的O-聚糖或N-聚糖是由单糖砌块在细胞内质网和高尔基体中, 经糖基转移酶(Glycotransferases)和糖苷酶(Glycosidases)的协同作用

合成而得, 转位到细胞表面后, 这些糖缀合物(Glycoconjugates)可通过与其它生物分子的相互作用, 介导种类繁多的生理与病理过程(图1).

研究表明, 自然界中许多蛋白质与脂质受糖基化调控. 例如, 人血红细胞表面含有糖抗原, 其单糖分子的细微结构差异决定了个体的血型. 蛋白质丝/苏氨酸O-连接N-乙酰氨基葡萄糖糖基化修饰(O-GlcNAcylation)调控了胚胎发育、转录、表观遗传修饰和细胞信号转导等多种生理学过程^[1], 还参与介导了包括肿瘤、神经退行性疾病在内的人类重大疾病的发生和发展^[2].

此外, 细胞表面的糖链还可以成为病毒的入侵位点, 例如甲型流感病毒表面含有可识别唾液酸寡糖的

引用格式: Hu XL, He XP. Chemical tools capable of probing the dynamic glycosylation/de-glycosylation processes and sugar-protein interactions *in-situ*. *Sci Sin Chim*, 2024, 54: 716–725, doi: 10.1360/SSC-2023-0241

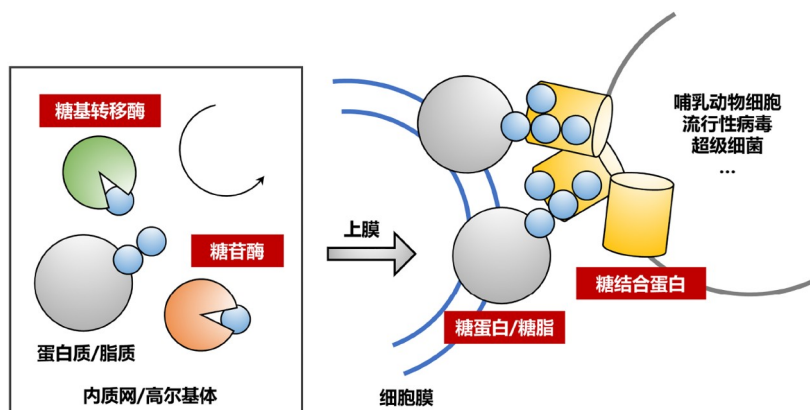


图 1 糖基转移酶与糖苷酶在细胞内质网和高尔基体内协同催化合成基于蛋白质和脂质的糖缀合物, 及其转位至细胞膜后通过糖与蛋白质相互作用介导种类多样的生理与病理过程 (网络版彩图)

Figure 1 Schematic illustration of the biosynthetic pathway of glycoconjugates catalyzed by glycotransferases and glycosidases, and the translocation of the glycoconjugates to the cell membrane in order to mediate a variety of physiological and pathological events through sugar-protein interactions (color online).

红血球凝集素(Hemagglutinin), 当其识别特异性为 α -2,3连接的唾液酸寡糖时, 主要在禽类中传播, 而当其识别特异性突变为 α -2,6连接的唾液酸寡糖时, 病毒可跨物种感染人类^[3]. 又如, 文献报道新冠病毒表面的刺突蛋白(Spike protein)天冬酰胺343(N343)位的N-糖基化有利于其受体结合域的构象打开, 从而增强与宿主细胞受体蛋白的结合亲和力^[4]. 多组学研究表明, 糖基转移酶和糖苷酶这两类生物大分子糖化学修饰的关键酶群, 在许多疾病的发生与发展过程中异常调高或调低, 并与癌细胞耐药相关^[5], 提示其或可成为全新的疾病诊治标志物.

除了其固有的生物学功能, 糖识别蛋白还被发展为药物靶向递送的分子靶标. 脱唾液酸糖蛋白受体(Asialoglycoprotein receptor, ASGPr)是一种特异性表达在肝实质细胞表面的C-型凝集素, 负责体内脱唾液酸糖蛋白的稳态调控^[6]. 美国Alynham制药公司成功将ASGPr发展为核酸药物递送靶标, 通过糖与凝集素之间多价态识别的亲合力(Avidity)放大策略, 实现了小干扰RNA(siRNA)的长效肝靶向递送, 迄今已有5款药物获美国食药监局(FDA)批准用于临床^[7]. 近期, Bertozzi等人^[8]报道了一种全新的糖靶向蛋白质降解策略LYTAC(Lysosome-Targeting Chimaera), 通过糖聚合物与抗体分子的共价偶联, 实现了特定细胞膜蛋白以及胞外蛋白的糖靶向溶酶体降解^[9,10].

上述研究进展充分说明了对于生物大分子糖修饰

与糖识别的精确理解, 可为人类重大疾病的精准诊治提供全新依据. 然而, 能够在细胞原位实时探测糖如何介导生命信息动态变化的通用化学工具仍相对缺乏. 本文作者团队一直致力于合理运用化学原理与手段, 发展分子探针体系, 实现糖动态修饰与生物识别的原位、高通量、无损探测. 本文将系统介绍团队所发展的代表性荧光分子探针原型, 及其在糖生物学研究中的实用范例, 以期在糖组学的解码提供全新化学技术.

2 糖介导生物学过程的原位化学探测研究进展

近年来, 我们系统性针对生物大分子糖动态修饰与糖信息分子介导的生物识别过程, 发展了基于“光致变色”和“构象折叠”这两类荧光分子探针原型的化学探测技术, 实现了上述糖生物学事件的细胞原位探测及无损高通量筛选. 由于生物分子的糖基化与去糖基化修饰普遍发生于细胞内的亚细胞结构中, 如何在这些微小的细胞器中原位探测糖动态修饰反应, 是糖生物学研究领域的技术难点. 针对该关键问题, 我们使用了“光致变色”这一适配超高分辨显微技术的分子探针原型, 利用简易的点击化学及经典的糖基化反应等化学策略将糖基与光致变色基团偶联, 继而利用超高分辨显微镜实现了多个糖介导动态生物学事件的亚细

胞层次原位可视化。

另一方面,糖与其识别蛋白的原位、无损探测也是糖组学研究的重要技术关键,有别于传统的固相糖阵列实验,我们通过逆向思维,将具有独特光物理性质的荧光分子探针针对糖基进行化学标记,而当糖与其识别蛋白相互在溶液体系中相互作用后,可直接显著改变所标记荧光分子的发射强度或波长,从而在病毒、细菌等多尺度下实现糖-蛋白质相互作用的原位、无损探测。下文将对上述两个部分的工作进行系统性回顾。

2.1 糖动态修饰的原位化学探测

生物大分子,如蛋白质和脂质的糖基化修饰是在糖基转移酶和糖苷酶的协同作用下,于内质网和高尔基体中完成的,而这些新生的糖缀合物一般在细胞膜表面定位,并参与介导数量众多的生理与病理过程。发展可以在活细胞中原位探测这些糖基化、去糖基化动态过程的化学技术,是当前糖化学生物学领域的前沿研究热点。

Bertozzi团队^[11]开发了基于叠氮修饰*N*-乙酰氨基甘露糖为前体的非天然糖衍生物,通过细胞代谢最终将该衍生物转化为内源性糖链末梢的唾液酸基元,其所携带的叠氮基团可进一步与荧光团修饰的环辛炔标签发生生物正交反应,继而在活细胞和活体内实现生物大分子唾液酸糖修饰的原位荧光可视化。基于该创新化学策略,Bertozzi与Sharpless和Meldal共同获得了2022年诺贝尔化学奖。这一生物正交化学策略在活细胞糖基化示踪中得到了广泛的应用与拓展^[12]。

我国科学家在糖基转移酶活力的细胞原位荧光可视化领域也做出了突出贡献。例如,Chen课题组^[13]报道了一种基因编码代谢糖标记策略,将可特异性识别特殊非天然*N*-乙酰氨基葡萄糖(GlcNAc)衍生物的糖基转移酶突变体选择性表达在心肌细胞中,继而实现了该特定细胞中GlcNAc糖基化修饰蛋白垂钧,并验证了该策略适用于转基因小鼠。该课题组还进一步将膨胀显微成像技术引入糖代谢标记,实现了不同非天然糖在不同类型细胞中的超高分辨代谢可视化定位^[14]。此外,其他研究团队还开发了基于核酸适体临近标记特定蛋白质糖基化修饰^[15],及DNA编码同时测定特定蛋白上多种糖型的化学标记策略^[16]。然而如何在这一新兴领域中发展更为普适、精准的化学探测技术,从而

更好地实现活细胞原位复杂糖动态修饰过程的荧光可视化,仍极具挑战。

生物大分子的糖基化与去糖基化过程一般都发生在内质网、高尔基体、溶酶体等亚细胞结构中,于是如何精确地在这些尺寸更小的亚细胞器中实时捕捉糖动态修饰行为,对糖生物学的精准研究至关重要。传统的荧光可视化标签往往具有“常亮型”特征,易受生物背景光干扰,且由于衍射极限的局限,较难在亚细胞尺度上探测上述动态过程。针对这一问题,我们创制了基于“光致变色”的糖分子探针体系,实现了细胞原位糖生物学事件的精细化探测。

螺吡喃(Spiropyran, SP)分子可在紫外光辐射下结构转变为部花菁(Merocyanine, MR),继而从无荧光态转变为荧光发射态,而MR可继续在可见光的辐射下结构逆转为SP,导致荧光猝灭。这一经典的光致变色过程具有往复可逆的特点,从而产生荧光闪烁现象,而这一现象符合基于随机光学重构的超高分辨显微技术原理(例如Stochastic Optical Reconstruction Microscopy, STORM)^[17]。

由此,我们提出了将SP/MR光致变色基团与糖分子偶联,从而实现通过荧光闪烁现象在亚细胞结构中定位糖动态生物学过程的设想。首先,我们合成了一种SP/MR与萘酰亚胺(Naph)通过酰胺键共价连接的荧光分子对,其中SP和Naph不发生荧光共振能量转移(FRET),而MR与Naph间发生FRET,在激发Naph时MR发光。继而,我们将可靶向ASGPr的半乳糖与上述分子对通过点击化学偶联,实验表明,探针孵育ASGPr高表达的人原发性肝癌细胞系HepG2后,在半乳糖靶基团的介导下,可诱导受体内吞并转位至溶酶体,从而将SP/MR与Naph的偶联体标签定位到该亚细胞器。进一步经紫外/可见光循环照射后,观测到溶酶体中呈现探针Naph部分的荧光发射,且荧光随紫外/可见光的往复照射产生闪烁现象,初步证实了我们基于光致变色原理实现亚细胞结构定位可视化的设想(图2)^[18]。有趣的是,细胞内源性的磷酸盐可通过Michael加成反应破坏MR的烯键结构,从而阻断其向SP态的可逆转变,使探针处于一种“常亮”状态,为活细胞内活性硫物种的糖靶向原位探测提供了新的手段。

进一步工作中,为解决上述探针由于疏水堆积在水溶液中发光不强的缺陷,我们提出了使用人血清白蛋白(HSA)作为高生物相容度主体分子的超分

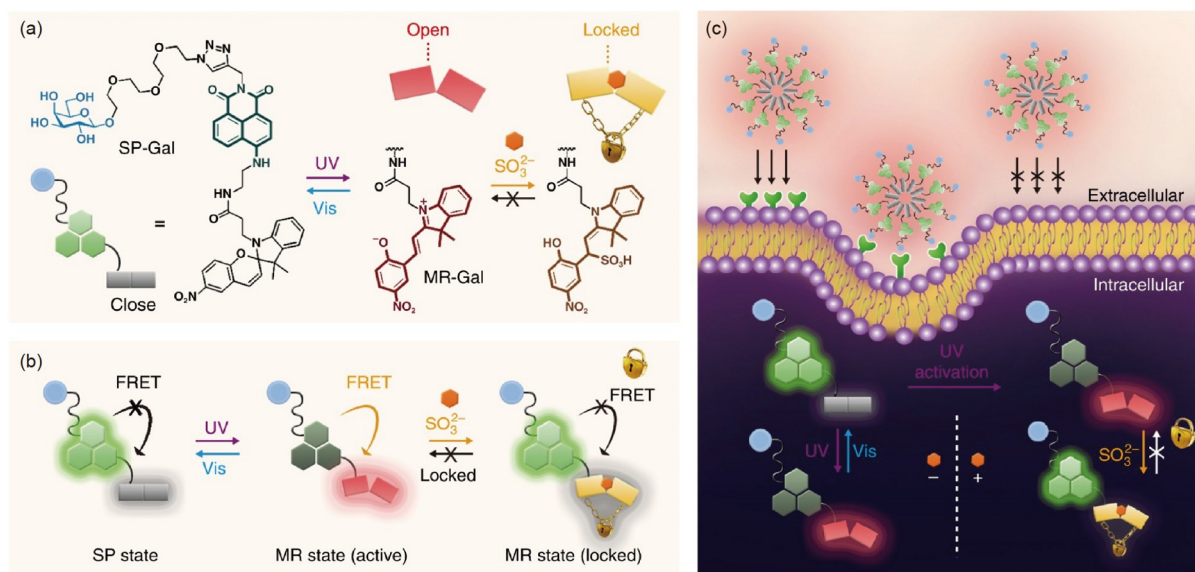


图 2 基于SP/MR的糖光致变色探针构建及其ASGPr靶向介导溶酶体转位和光调控荧光闪烁成像: (a) 半乳糖偶联光致变色探针结构与光致变色原理示意; (b) 由光致变色调控的Naph与SP/MR间FRET过程卡通示意; (c) 糖基光致变色探针所形成多价态糖簇的受体靶向细胞内化及胞内光致变色行为调控^[18] (网络版彩图)

Figure 2 Photochromic glycoprobes based on SP/MR for the ASGPr-mediated translocation to the lysosomes for photo-controlled fluorescence-blinking imaging. (a) Structure and photochromic activity of the galactose-modified photochromic probe developed. (b) Cartoon illustrating the FRET process between Naph to SP/MR as modulated by photochromism. (c) Targeted endocytosis of multivalent glycomicelles formed by the photochromic glycoprobe and their intracellular photochromic actions achieved by alternate light irradiations. Reproduced with permission from Ref. [18]. Copyright@2017, Springer Nature (color online).

子策略. 将探针与HSA主客体包结后, 存在于HSA中的MR不但表现出更强的荧光发射, 还实质性提升了SP/MR的光致互变性能, 继而在糖受体高表达的细胞中原位实现了Naph和MR两种荧光的光控可逆切换^[19].

最终, 我们发展了基于光致变色原理的糖动态修饰探测体系. β -半乳糖苷酶(β -Gal)负责水解糖缀合物末端的半乳糖残基, 其在衰老细胞^[20,21], 以及多种卵巢癌细胞中高表达^[22]. 前期工作中, Urano课题组^[23]通过优化荧光素的螺环结构, 开发了具有膜渗透性的 β -Gal探针, 证明了探针可在荧光引导下辅助诊断卵巢癌腹膜转移. Zhu课题组^[24]开发了一种 β -Gal激活型聚集诱导发光(Aggregation-Induced Emission, AIE)探针, 其经酶水解释放的AIE基团可在细胞原位形成高亮度荧光聚集体, 继而在活细胞和活体中实现内源性 β -Gal激活的长时间荧光成像. Kim课题组^[25]开发了探测另一类细胞衰老过程中高表达糖苷酶: α -L-岩藻糖苷酶(α -Fuc)的AIE探针, 并验证了探针在长效示踪 β -Gal低表达衰老细胞示踪中的应用潜力. Guo课题组^[26]开发了 β -Gal激活的近红外荧光探针及前药分子, 在自然衰

老和药物诱导衰老的小鼠模型中, 成功实现了衰老细胞在体靶向清除. Shin课题组^[27]于近期系统总结了靶向糖苷酶的激活型荧光探针及结合型底物模拟物策略. 然而, 可在细胞原位示踪糖苷酶活力的超高分辨探针显见文献报道.

为验证光致变色体系在细胞原位超高分辨探测生物大分子糖动态修饰调控因子中的适用性, 我们将半乳糖底物以 β -O-糖苷键的形式直接糖基化在MR的苯酚位点, 从而阻断其光致变色性能. 当 β -Gal水解半乳糖底物后, MR向SP光诱导结构转变的性能被激活, 从而获得荧光闪烁信号. 应用该探测原理, 我们实现了不同细胞表型内源性 β -Gal的STORM原位超高分辨成像, 并揭示了 β -Gal在衰老细胞中主要定位在溶酶体, 而在卵巢癌细胞中全胞质分布(图3)^[28].

上述系列工作为生物大分子糖基化与去糖基化动态修饰的亚细胞层次原位探测提供了全新化学技术, 光致变色基团还有望衍生为一种可用于超高分辨显微技术的生物正交化学标签, 从而提升活细胞中糖生物学过程研究的精确性.

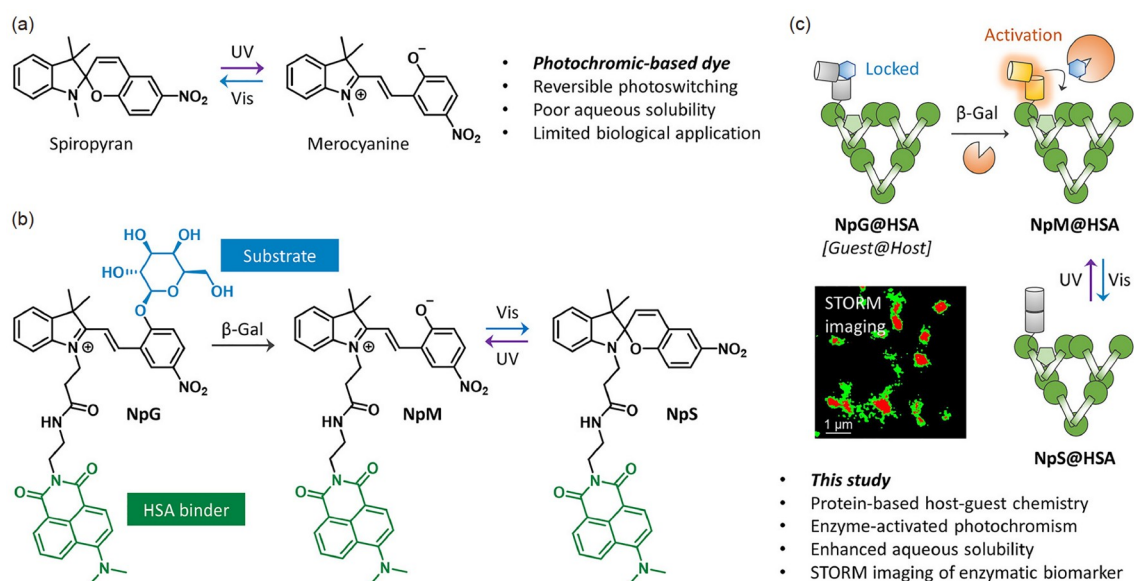


图3 糖光致变色探针实现糖苷酶亚细胞结构定位超高分辨成像: (a) SP与MR的可逆光调控结构互变; (b) 糖苷酶激活型光致变色探针结构与工作原理; (c) 糖苷酶激活型光致变色探针与白蛋白复合物实现亚细胞结构超高分辨成像^[28] (网络版彩图)

Figure 3 Photochromic glycoprobes for the super-resolution imaging of glycosidase activity at the subcellular level. (a) Light-induced reversible structural conversion between SP and MR. (b) Structure and working mechanism of the glycosidase-activatable photochromic glycoprobe. (c) Cartoon illustrating the mechanism by which the glycosidase-activatable probe achieves super-resolution imaging of subcellular organelles. Reproduced with permission from Ref. [28]. Copyright©2020, American Chemical Society (color online).

2.2 糖生物识别的原位无损高通量筛选

经糖基转移酶和糖苷酶修饰调控的糖缀合物,通常以与其它生物分子相互作用的形式调控细胞命运,探究这些复杂新生糖链的生物分子(尤其是蛋白质)识别特异性是糖组学研究的重要方向. 糖微阵列实验(Glyco-microarray)是测定糖与蛋白质之间相互作用的经典技术,该技术通过对不同天然及非天然来源糖片段异头碳的衍生化,将糖以阵列的形式铺展在固相表面,继而通过对待测蛋白质的荧光标记,被标记蛋白与糖固相阵列的孵育及表面清洗,最终测定滞留在糖阵列表面蛋白质的荧光信号,并通过信号强弱分析糖与蛋白质结合亲和力的大小^[29-31];

糖微阵列实验具有高通量、高灵敏度、微量上样等优势,已成为全世界范围内检测糖与蛋白质选择性相互作用的标准手段。然而,该方法的仪器成本和技术要求相对较高,且不可避免的化学标记步骤可能会对蛋白质构象带来改变,从而导致其识别特异性偏差。此外,使用含标签的特异性抗体间接标记蛋白质也会为检测增加额外的抗体构建成本与操作步骤。于是发展新一代简易、蛋白质免标记的高通量筛选技术成为

了糖科学领域的研究热点.

例如, Field课题组^[32]通过一锅法构建了甘露糖修饰的CdS量子点, 量子点表面多价态分布的甘露糖与大肠杆菌表达的甘露糖识别蛋白FimH之间发生的选择性相互作用, 导致量子点本征荧光信号和粒径变化, 继而实现了大肠杆菌糖结合蛋白的原位无损检测. 该团队还通过点击化学结合静电作用, 构建了表面修饰糖分子的糖簇纳米金颗粒, 基于不同结构糖分子与不同类型凝集素之间的亲和力差异诱导金颗粒不同程度的聚集, 从而直接通过材料的颜色变化实现了不同物种来源凝集素的裸眼检测^[33]. Liu与Fan课题组^[34]合作开发了一种基于糖基修饰发光共轭聚合物与氧化石墨烯超分子复合的均相体系, 实现了无标记凝集素的荧光“点亮”检测. 除了纳米与高分子材料以外, 糖修饰的AIE小分子荧光探针也被证明适用于无标记凝集素的生物传感^[35].

在早期研究工作中, 我们发展了一种基于电化学的糖微阵列技术, 实现了糖识别蛋白的直接检测. 通过将糖的异头碳与电活性的酞基短程偶联获得“带电的糖”, 进一步将其固定在电极表面即可得到酞与氢酞

间的氧化还原电化学信号. 将可特异性识别糖片段的天然凝集素与电极孵育后, 我们观测到电流的选择性猝灭, 而孵育不识别该糖型的凝集素不产生信号干扰, 运用该电化学技术我们成功实现了植物凝集素^[36]及细胞表面C-型凝集素^[37,38]的直接检测.

考虑到固相阵列的应用范围局限性, 我们进一步致力于创制可在均相直接检测糖与生物分子间识别特异性的分子探针体系. 通过将糖分子与荧光染料直接偶联, 及该偶联体与氧化石墨烯的自组装, 构建了糖簇状分布, 且荧光猝灭的超分子糖簇材料. 进一步将该糖簇材料与具有识别特异性的天然凝集素孵育后, 可获得浓度依赖性的荧光恢复信号, 检测灵敏度达到纳摩尔水平. 通过分子、细胞与组织水平实验, 我们验证了该糖簇材料体系可通过荧光特异性激活的模式, 实现糖识别蛋白的均相、无损探测, 并可拓展应用于糖靶向细胞与在体荧光成像^[39-44].

除使用具备特殊光学性能的辅助材料外, 我们还设计了多系列可直接通过蛋白质识别改变荧光信号的小分子探针原型. 首先, 我们设计了一类基于Naph与芘基(Pyrene, Pyr)两种荧光团偶联的折叠探针体系, 将

两者通过长短合适的柔性链偶联, 获得Naph-Pyr的二聚折叠体, 由于疏水堆积, 该二聚体在水溶液中发光微弱. 继而对该折叠体通过点击化学与糖基偶联, 当糖基部分与特异性凝集素的碳水化合物识别域结合后, 探针部分的疏水折叠由于与周边蛋白质残基的相互作用而展开, 继而在光激发时经由Pyr与Naph之间的FRET效应, 发射强烈荧光. 基于该双荧光团折叠探针体系, 我们实现了不同糖识别特异性凝集素^[45], 以及流感病毒表面血凝素唾液酸寡糖识别特异性的高通量均相测试(图4)^[46]. 该探针体系还被证明适用于在哺乳动物细胞原位, 实时示踪糖受体蛋白经内涵体转位到溶酶体的生物学过程.

在上述基于两个荧光团偶联的折叠探针工作基础上, 我们进一步寻求使用更为简易的单分子原型作为标签, 实现糖与蛋白质识别特异性探测的可行性. 振动诱导发光(Vibration-Induced Emission, VIE)是我国科学家田禾院士团队首次提出的一种特殊分子发光机制^[47,48]. 具备VIE特征的*N,N'*-二取代-二氢二苯并[a,c]吩嗪分子在良分散态受辐射激发后, 其激发态构象可弛豫到平面共轭状态, 发出偏红色的荧光. 而当该分

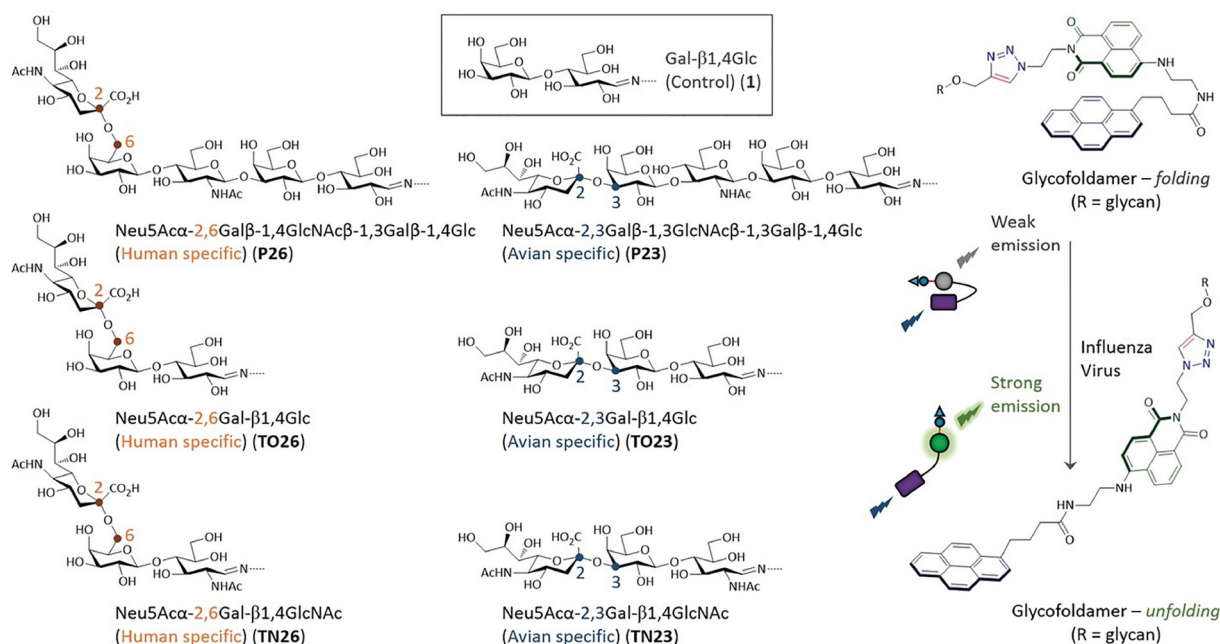


图 4 由两种荧光团偶联形成的糖折叠探针实现甲型流感病毒宿主唾液酸寡糖识别特异性的高通量、均相筛选^[46] (网络版彩图)

Figure 4 Glycofoldamers formed by the coupling between two independent fluorophores achieving the label free, high-throughput screening of the host-cell sialylglycan affinity of influenza A viruses in a homogenous fashion. Reproduced with permission from Ref. [46]. Copyright@2016, John Wiley and Sons (color online).

子受微环境影响处于构象僵化(折叠)的状态时, 其激发态构象的共轭性减弱, 荧光发射显著蓝移. 基于这一独特的单分子构象折叠导致荧光发射波长改变的现象, 我们提出以VIE为标签修饰糖分子, 并通过糖与蛋白质之间的生物识别引导其构象折叠, 从而呈现荧光发射迁移.

我们将氧胺修饰的VIE衍生物与一系列 α -2,3和 α -2,6连接的唾液酸寡糖的还原端进行脎化反应, 构建VIE标记的寡糖库, 并将这些寡糖探针与表达不同血凝素亚型的甲型流感病毒在均相中高通量孵育. 通过简单的荧光酶标仪检测, 我们发现人流感病毒孵育 α -2,6连接唾液酸寡糖探针后导致探针荧光迁移, 而 α -2,3连接唾液酸寡糖探针与禽流感病毒孵育后荧光蓝移, 反之则不发生荧光改变. 有趣的是, 人、禽双感染特征的流感病毒可诱导 α -2,6连接与 α -2,3连接唾液酸寡糖探针都发生荧光迁移, 证明了探针的生物识别特异性. 进一步通过生物小角度散射实验结合计算机模拟, 验证了当探针的寡糖部分与血凝素糖识别结构域结合后, VIE分子可与蛋白质周边的残基相互作用, 从而使构象折叠, 导致荧光蓝移(图5)^[49].

利用该简易体系及主成分分析方法, 我们还实现了流感病毒与包括新冠病毒、埃博拉病毒等其它种属病毒之间的高效区分, 以及不同基因型流感病毒之间的聚类分析. 此外, 该均相实验还被证明可用于腺病毒载体流感疫苗糖识别特征的分析, 从而为疫苗质控提供了新的方法. 除病毒外, 我们还证明基于VIE体系的分子探针可用于精确区分不同基因型超级细菌的细胞壁肽聚糖及磷壁酸结构^[50].

3 总结与展望

随着人类基因组学与蛋白质组学的不断发展, 人类糖组学解码已成为科学与工业界共同关注的重要生命科学难题, 而发展高效、普适的化学工具对该领域的快速发展至关重要. 本文主要回顾了我们研究团队前期在糖动态修饰与生物识别原位探测领域所构建的系列化学技术, 包括基于光致变色的超高分辨标签体系, 及基于分子构象自适应改变的比率荧光探针体系, 分别实现了糖动态生物学过程的亚细胞层次原位示踪, 以及糖识别蛋白的原位、高通量探测. 下一步工作

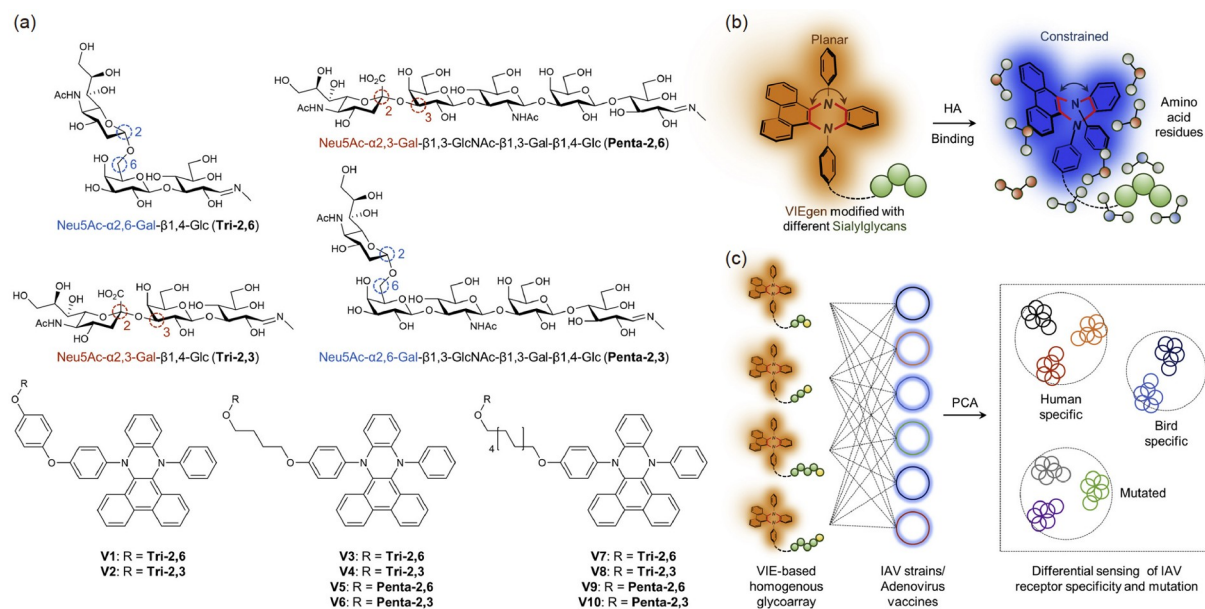


图 5 基于单一荧光团的糖构象折叠探针实现甲型流感病毒宿主唾液酸寡糖识别特异性的高通量、免标记均相筛选: (a) VIE 标记的唾液酸寡糖探针结构与 (b) 工作原理; (c) 探针阵列结合主成分分析实现甲型流感病毒唾液酸寡糖识别特征分型^[49] (网络版彩图)

Figure 5 Single-molecule glycoprobe based on vibration-induced emission achieving the label free, high-throughput screening of the host-cell sialylglycan affinity of influenza A viruses in a homogenous fashion. (a) Structure and (b) working mechanism of VIE-labelled sialylglycans. (c) High-throughput screening combined with PCA to achieve the classification of influenza A viruses with different receptor specificities. Reproduced with permission from Ref. [49]. Copyright@2022, Elsevier (color online).

中, 我们拟进一步聚焦重要生理、病理过程中的糖生物学事件, 合理运用前期所发展的分子探针体系, 揭示更多未知的糖介导生物学过程。

我们也将进一步致力于上述体系的性能优化, 例如在细胞原位探测糖基转移酶与糖苷酶活力的研究中, 靶标分子的亚细胞定位精确性有待进一步提高, 对探针分子进行特定亚细胞器的靶向基团修饰或许可为这一问题提供有效解决方案。同时, 对于糖苷酶探针的

设计应加入共价偶联基团以实现靶标垂钓^[51,52], 且对于相同糖型、不同亚型的糖苷酶区分是精细化研究糖基水解过程的重要因素。最终, 对于糖生物识别的均相探测体系而言, 如何实质性扩大糖型体适用范围, 及提升检测灵敏度是未来需要努力的重要方向。无论如何, 我们相信通过对化学原理与技术的合理运用^[53,54], 将会有更多高效、普适性的探测技术问世, 为人类乃至全物种糖组学解码提供全新解决方案。

致谢 感谢华东理工大学田禾院士、朱为宏院士, 中国人民解放军海军军医大学王红阳院士团队, 中国科学院上海药物研究所陈凯先院士、李佳研究员团队, 上海交通大学陈代杰教授, 天津医科大学周东明教授, 荷兰格罗宁根大学Bennard L. Feringa院士、美国德克萨斯大学奥斯汀分校Jonathan L. Sessler院士、英国巴斯大学Tony D. James教授、韩国梨花女子大学Juyoung Yoon教授、韩国高丽大学Jong Seung Kim教授等对上述工作的悉心指导与宝贵建议。感谢国家自然科学基金委“生物大分子动态修饰与化学干预”重大研究计划对本项目的资助。

参考文献

- 1 Saha A, Bello D, Fernández-Tejada A. *Chem Soc Rev*, 2021, 50: 10451–10485
- 2 Yang X, Qian K. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2017, 18: 452–465
- 3 Lloyd-Smith JO. *Nature*, 2017, 546: 603–604
- 4 Sztain T, Ahn SH, Bogetti AT, Casalino L, Goldsmith JA, Seitz E, McCool RS, Kearns FL, Acosta-Reyes F, Maji S, Mashayekhi G, McCammon JA, Ourmazd A, Frank J, McLellan JS, Chong LT, Amaro RE. *Nat Chem*, 2021, 13: 963–968
- 5 Li Y, Lin Y, Aye L, Dong L, Zhang C, Chen F, Liu Y, Fan J, Gao Q, Lu H, Lu C, Zhang S. *Clin Transl Med*, 2022, 12: e872
- 6 Ashwell G, Morell AG. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, 1974, 41: 99–128
- 7 Kulkarni JA, Witzigmann D, Thomson SB, Chen S, Leavitt BR, Cullis PR, van der Meel R. *Nat Nanotechnol*, 2021, 16: 630–643
- 8 Banik SM, Pedram K, Wisnovsky S, Ahn G, Riley NM, Bertozzi CR. *Nature*, 2020, 584: 291–297
- 9 Ahn G, Banik SM, Miller CL, Riley NM, Cochran JR, Bertozzi CR. *Nat Chem Biol*, 2021, 17: 937–946
- 10 Ahn G, Riley NM, Kamber RA, Wisnovsky S, von Hase SM, Bassik MC, Banik SM, Bertozzi CR. *Science*, 2023, 382: eadf6249
- 11 Chang PV, Prescher JA, Sletten EM, Baskin JM, Miller IA, Agard NJ, Lo A, Bertozzi CR. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 1821–1826
- 12 Sletten EM, Bertozzi CR. *Acc Chem Res*, 2011, 44: 666–676
- 13 Fan X, Song Q, Sun D, Hao Y, Wang J, Wang C, Chen X. *Nat Chem Biol*, 2022, 18: 625–633
- 14 Sun D, Fan X, Shi Y, Zhang H, Huang Z, Cheng B, Tang Q, Li W, Zhu Y, Bai J, Liu W, Li Y, Wang X, Lei X, Chen X. *Nat Methods*, 2021, 18: 107–113
- 15 Zhu L, Xu Y, Wei X, Lin H, Huang M, Lin B, Song Y, Yang C. *Angew Chem Int Ed*, 2021, 60: 18111–18115
- 16 Li S, Liu Y, Liu L, Feng Y, Ding L, Ju H. *Angew Chem Int Ed*, 2018, 57: 12007–12011
- 17 Rust MJ, Bates M, Zhuang X. *Nat Methods*, 2006, 3: 793–796
- 18 Zhang J, Fu Y, Han HH, Zang Y, Li J, He XP, Feringa BL, Tian H. *Nat Commun*, 2017, 8: 987–995
- 19 Fu Y, Han HH, Zhang J, He XP, Feringa BL, Tian H. *J Am Chem Soc*, 2018, 140: 8671–8674
- 20 Lowe D, Horvath S, Raj K. *Oncotarget*, 2016, 7: 8524–8531
- 21 Itahana K, Campisi J, Dimri GP. *Biological Aging Methods and Protocols*, 2007, 371: 21–31
- 22 Wang W, Vellaisamy K, Li G, Wu C, Ko CN, Leung CH, Ma DL. *Anal Chem*, 2017, 89: 11679–11684
- 23 Asanuma D, Sakabe M, Kamiya M, Yamamoto K, Hiratake J, Ogawa M, Kosaka N, Choyke PL, Nagano T, Kobayashi H, Urano Y. *Nat Commun*, 2015, 6: 6463
- 24 Gu K, Qiu W, Guo Z, Yan C, Zhu S, Yao D, Shi P, Tian H, Zhu WH. *Chem Sci*, 2019, 10: 398–405

- 25 Koo S, Won M, Li H, Kim WY, Li M, Yan C, Sharma A, Guo Z, Zhu WH, Sessler JL, Lee JY, Kim JS. *Chem Sci*, 2021, 12: 10054–10062
- 26 Shi D, Liu W, Gao Y, Li X, Huang Y, Li X, James TD, Guo Y, Li J. *Nat Aging*, 2023, 3: 297–312
- 27 Kim Y, Li H, Choi J, Boo J, Jo H, Hyun JY, Shin I. *Chem Soc Rev*, 2023, 52: 7036–7070
- 28 Chai X, Han HH, Sedgwick AC, Li N, Zang Y, James TD, Zhang J, Hu XL, Yu Y, Li Y, Wang Y, Li J, He XP, Tian H. *J Am Chem Soc*, 2020, 142: 18005–18013
- 29 Stevens J, Blixt O, Paulson JC, Wilson IA. *Nat Rev Microbiol*, 2006, 4: 857–864
- 30 Childs RA, Palma AS, Wharton S, Matrosovich T, Liu Y, Chai W, Campanero-Rhodes MA, Zhang Y, Eickmann M, Kiso M, Hay A, Matrosovich M, Feizi T. *Nat Biotechnol*, 2010, 28: 178
- 31 Fukui S, Feizi T, Galustian C, Lawson AM, Chai W. *Nat Biotechnol*, 2002, 20: 1011–1017
- 32 Mukhopadhyay B, Martins MB, Karamanska R, Russell DA, Field RA. *Tetrahedron Lett*, 2009, 50: 886–889
- 33 Hernando PJ, Ivanova IM, Chessa S, Marin MJ, Dedola S, Field RA. *Org Chem Front*, 2023, 10: 3819–3829
- 34 Wang L, Pu KY, Li J, Qi X, Li H, Zhang H, Fan C, Liu B. *Adv Mater*, 2011, 23: 4386–4391
- 35 Zhang JD, Mei J, Hu XL, He XP, Tian H. *Small*, 2016, 12: 6562–6567
- 36 He XP, Wang XW, Jin XP, Zhou H, Shi XX, Chen GR, Long YT. *J Am Chem Soc*, 2011, 133: 3649–3657
- 37 Li Z, Deng SS, Zang Y, Gu Z, He XP, Chen GR, Chen K, James TD, Li J, Long YT. *Sci Rep*, 2013, 3: 2293–2299
- 38 He XP, Zhu BW, Zang Y, Li J, Chen GR, Tian H, Long YT. *Chem Sci*, 2015, 6: 1996–2001
- 39 Zhang HL, Wei XL, Zang Y, Cao JY, Liu S, He XP, Chen Q, Long YT, Li J, Chen GR, Chen K. *Adv Mater*, 2013, 25: 4097–4101
- 40 Ji DK, Zhang Y, Zang Y, Li J, Chen GR, He XP, Tian H. *Adv Mater*, 2016, 28: 9356–9363
- 41 Ji DK, Chen GR, He XP, Tian H. *Adv Funct Mater*, 2015, 25: 3483–3487
- 42 Song JX, Tang XY, Zhou DM, Zhang W, James TD, He XP, Tian H. *Mater Horiz*, 2017, 4: 431–436
- 43 Hu XL, Zang Y, Li J, Chen GR, James TD, He XP, Tian H. *Chem Sci*, 2016, 7: 4004–4008
- 44 Hu XL, Cai Q, Gao J, Field RA, Chen GR, Jia N, Zang Y, Li J, He XP. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2019, 11: 22181–22187
- 45 Li KB, Li N, Zang Y, Chen GR, Li J, James TD, He XP, Tian H. *Chem Sci*, 2016, 7: 6325–6329
- 46 He XP, Zeng YL, Tang XY, Li N, Zhou DM, Chen GR, Tian H. *Angew Chem Int Ed*, 2016, 55: 13995–13999
- 47 Huang W, Sun L, Zheng Z, Su J, Tian H. *Chem Commun*, 2015, 51: 4462–4464
- 48 Zhang Z, Wu YS, Tang KC, Chen CL, Ho JW, Su J, Tian H, Chou PT. *J Am Chem Soc*, 2015, 137: 8509–8520
- 49 Dou WT, Wang X, Liu T, Zhao S, Liu JJ, Yan Y, Li J, Zhang CY, Sedgwick AC, Tian H, Sessler JL, Zhou DM, He XP. *Chem*, 2022, 8: 1750–1761
- 50 Hu XL, Gan HQ, Qin ZY, Liu Q, Li M, Chen D, Sessler JL, Tian H, He XP. *J Am Chem Soc*, 2023, 145: 8917–8926
- 51 Komatsu T, Kikuchi K, Takakusa H, Hanaoka K, Ueno T, Kamiya M, Urano Y, Nagano T. *J Am Chem Soc*, 2006, 128: 15946–15947
- 52 Umezawa K, Yoshida M, Kamiya M, Yamasoba T, Urano Y. *Nat Chem*, 2017, 9: 279–286
- 53 He XP, Tian H. *Chem*, 2018, 4: 246–268
- 54 Dou WT, Han HH, Sedgwick AC, Zhu GB, Zang Y, Yang XR, Yoon J, James TD, Li J, He XP. *Sci Bull*, 2022, 67: 853–878

Chemical tools capable of probing the dynamic glycosylation/de-glycosylation processes and sugar–protein interactions *in-situ*

Xi-Le Hu¹, Xiao-Peng He^{1,2*}

¹ Key Laboratory for Advanced Materials and Joint International Research Laboratory of Precision Chemistry and Molecular Engineering, Feringa Nobel Prize Scientist Joint Research Center, School of Chemistry and Molecular Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China

² National Center for Liver Cancer, the International Cooperation Laboratory on Signal Transduction, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Shanghai 200438, China

*Corresponding author (email: xphe@ecust.edu.cn)

Abstract: With the rapid advancement of human genomics and proteomics, the study of human glycomics has recently become the focus of many chemists and biologists in the 21st century. Compared to those developed for genomic and proteomic studies, chemical tools for the effective study of the glycomics are much fewer. This account will summarize our recent progress in the development of novel chemical probes for the *in-situ* detection of the glycosylation/de-glycosylation processes of biomolecules and sugar-protein interactions. We will discuss the principles to design fluorescent probes for the super-resolution imaging of sugar-mediated glycobiological processes in cells, and homogeneous fluorogenic arrays for the high-throughput screening of sugar–protein interactions in a label-free manner. A perspective is also given with respect to the future directions of developing chemical tools for the study of glycobiology.

Keywords: chemical biology, glycomics, fluorescent probe, dynamic, *in-situ*, living cells

doi: [10.1360/SSC-2023-0241](https://doi.org/10.1360/SSC-2023-0241)