



多肽荧光探针在蛋白质检测中的应用

黄志平*, 田兴涛, 吴为辉, 张鸣

北京防化学院生化防护系, 北京 102205

*通讯作者, E-mail: hzp03@mails.tsinghua.edu.cn

收稿日期: 2013-04-25; 接受日期: 2013-05-19; 网络版发表日期: 2013-06-20

doi: 10.1360/032013-179

摘要 荧光探针法是痕量蛋白质检测的重要方法, 其中多肽荧光探针得到了广泛的应用. 本文综述了 3 种主要类型多肽荧光探针, 即单荧光标记探针、双荧光标记探针和与其他材料形成复合物的探针的结构特点、检测原理以及不同类型多肽荧光探针在蛋白质定性、定量检测和酶活性测定等方面的应用, 并对多肽荧光探针的未来发展方向进行了展望.

关键词

多肽
荧光探针
蛋白质
检测

1 引言

蛋白质是生命活动的物质基础, 在生命现象和生命过程中起决定性的作用. 机体细胞中种类繁多的蛋白质各具不同的生理功能, 从而使细胞对胞外信号做出不同的生物学反应. 蛋白质之间的相互作用能够整合来自不同信号通路的信号并协调细胞内部的调节机制^[1]. 实现蛋白质准确灵敏的检测, 对生命奥秘的揭示、疾病诊治和药物筛选等领域均具有重要意义.

自蛋白质组学(proteomics)诞生以来, 建立简单、灵敏、快速、特异性强、高通量的蛋白质检测方法, 受到越来越多的关注, 已成为分析科学的研究重点之一. 荧光检测法因其具有灵敏度高、选择性好、动态响应范围宽和测定条件更接近生命体生理环境的优点而在蛋白质检测中应用广泛. 荧光探针法以靶向目标蛋白的荧光分子通过荧光增强或猝灭检测目标对象, 成为痕量蛋白质检测的重要方法. 新近的技术产生了各种各式智能探针, 其中多肽探针最为成功^[2]. 一个理想的多肽探针对目标物具有很高的亲和性和专一性. 迄今, 靶向于与不同疾病相关的受体和生物标记物的特定多肽已经出现. 这些目标多肽在精确的荧光标记技术帮助下形成多肽荧光探针, 通过与受体蛋白结合或被受体蛋白作用而发生荧光, 达到

检测目标蛋白的目的. 多肽荧光探针检测目标蛋白主要采用 3 种策略: (1) 单荧光标记, 荧光标记多肽与目标蛋白结合使目标蛋白获得荧光标记; (2) 双荧光标记, 标记后的多肽并不显示荧光, 受目标蛋白作用后荧光激活; (3) 单荧光标记多肽与其他材料构成复合材料, 同样也不显示荧光, 受目标蛋白作用后荧光激活. 3 种多肽荧光探针均以发生荧光作为检测蛋白质的信号, 因而可以用于靶向蛋白的分子成像, 成为现代诊断中不可缺少的技术^[3], 提供疾病信息精确和专一的诊断.

2 单荧光标记多肽探针

目前发展的单荧光修饰基团有近 30 种, 应用较为广泛的是羧基荧光素(FAM)、硫氰酸荧光素(FITC)、丹磺酰氯(dansyl chloride)、2,4-二硝基苯(Dnp)、羧基罗丹明 110 (carbo-xyrhodamine110)、德克萨斯红(Texas Red)、五甲川菁染料(Cy5)和七甲川菁染料(Cy7)等, 在多肽 N 端、Lys 或 Cys 侧链上引入荧光基团.

生物体内广泛存在的蛋白质特异识别的多肽是构建多肽探针的最佳来源. RGD 肽广泛存在于生物体内, 是细胞外多种配体蛋白与整合素(integrin)结合的位点. 整合素 $\alpha v \beta 3$ 在肿瘤生长、侵袭、转移过程

中起关键作用, 在正常血管内皮和上皮细胞中很少表达, 但在肿瘤细胞和肿瘤新生血管内皮细胞中却过度表达^[4]. 外源性 RGD 肽可与肿瘤细胞表面整合素结合. 因此, 将 RGD 肽与近红外荧光染料偶联, 利用 RGD 肽对整合素 $\alpha\beta3$ 特异结合的性质实现整合素的检测, 将有可能对特定恶性肿瘤近红外成像, 从而达到实时无损在位监测早期恶性肿瘤和抗整合素治疗的目的. Ye 等^[5]发展了多价 RGD 多肽探针, 用 A549 细胞系筛选得到一系列亲和力较强的含 RGD 序列单元的多肽单体和多聚体, 并以近红外荧光染料 cypate 进行标记, 结果表明, RGD 八聚体衍生物 cypate-[(RGD)₄-NH₂]₂ 在肿瘤细胞内的浓度明显高于其他衍生物, 显示该多肽探针在肿瘤显像中具有良好的应用前景. Wu 等^[6]将近红外荧光染料 Cy7 与 RGD 环肽共价结合构建了 RGD 肽复合物 Cy7-c(RGDyK)和 Cy7-PEG-c(RGDyK) (y 表示 D-型酪氨酸), 对整合素 $\alpha\beta3$ 阳性的胶质细胞瘤 U87MG 肿瘤模型进行体内成像. 研究结果显示, 在肿瘤细胞、血管内皮细胞等整合素 $\alpha\beta3$ 高表达的部位有更强的荧光信号, 而且 Cy7-c(RGDyK)在肿瘤部位比 Cy7-PEG-c(RGDyK)有更高的荧光强度. Chen 等^[7]将另一种近红外荧光染料 Cy5.5 与 RGD 肽偶联构成 RGD 多肽探针, 用于三维成像.

Kurzawa 等^[8]利用荧光多肽同时检测了细胞周期蛋白依赖性激酶(CDKs)和细胞周期蛋白(cyclin). CDKs 在细胞生长和分裂中起着中心作用, 与癌症细胞的持续增殖有关, 因而成为重要的药理靶标. Kurzawa 将结合 CDKs 和 cyclin 的底物多肽通过一段 15 个氨基酸的多肽连接, 构建了能同时结合 CDKs 和 cyclin 的多肽底物 HHAGPRKR/VHERYCSPTAG-SAKRRLFGED, 并通过中间的半胱氨酸 C 引入荧光基团 Cy3, 能同时检测活细胞内的 CDKs 和 cyclin. Reszka 等^[9]基于半胱氨酸蛋白酶-8 (caspase 8)四肽底物 IETD 合成了荧光标记多肽 Ac-IETD-AXX, 其中荧光报告基团 AXX 为 3-取代和 4-取代的香豆素或喹啉-2-酮, 用于酶的评价. Shi 等^[10]用荧光基团四苯基乙烯基(TPE)单标记蛋白酶底物多肽, 基于 TPE 与多肽是否结合疏水性质的改变而产生荧光检测蛋白酶. 将疏水基团 TPE 与半胱氨酸蛋白酶专一的多肽 DEVDK 连接, 在水溶液中几乎无荧光, 而受半胱氨酸蛋白酶切割后, TPE 发生聚集而引发荧光发射, 如图 1 所示. 用该荧光多肽探针检测半胱氨酸蛋白酶-3/7, 可用于酶抑制剂的筛选和细胞凋亡相关药效的评价. 本课

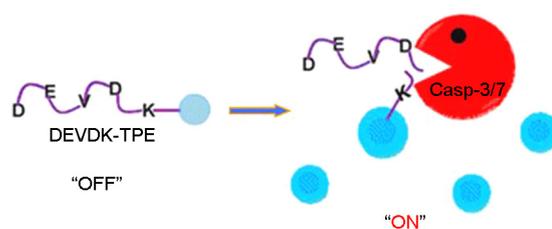


图 1 TPE-DEVDK 检测半胱氨酸蛋白酶示意图^[10]

题组致力于运用荧光多肽探针检测蛋白类生物毒素的研究. 生物毒素是生物源化学物质, 蛋白类生物毒素是其中的重要一类, 具有广泛的民用价值和潜在的生化威胁, 发展毒素检测、鉴别和防护手段的需求日益迫切. 通过筛选与生物毒素特异结合的多肽, 对其进行单荧光标记, 根据结合前后荧光性质的变化, 能够用于蓖麻毒素、相思子毒素等蛋白类生物毒素的检测.

Imperiali 等^[11]对运用溶剂敏感荧光基团监测蛋白质相互作用和动力学进行了综述. 溶剂敏感荧光基团具有对局部微环境性质敏感的荧光性质, 引入到多肽或蛋白质中, 构成荧光探针, 可应用于从蛋白质结构动态变化研究到蛋白质相互作用检测的领域. 溶剂敏感荧光基团包括内源性和外源性荧光基团. 色氨酸中吲哚荧光基团是内源性的, 对溶剂敏感, 在蛋白质体外研究中应用最广泛, 深化了对蛋白质折叠、配体作用等生化性质的理解; 而荧光性质不断改善的外源性合成染料的出现, 伴随着将荧光基团位点选择性或专一性地引入到多肽或蛋白质中方法的发展, 正在开启研究复杂生物体系之门. 例如, 吩噻染料(merocyanine dyes)显示特别大的消光系数, 具有较长的激发波长, 可以尽可能减小紫外光对细胞的损伤、消除自身荧光干扰, 适用于细胞研究. 在多肽或蛋白质中引入荧光基团的方法有直接共价修饰法和引入非天然氨基酸法. 常用的直接共价修饰法是通过半胱氨酸或赖氨酸侧链巯基或氨基等活性基团, 借助特异性反应引入荧光基团; 引入非天然氨基酸法即通过合成或半合成(表达蛋白的连接)等引入带有荧光基团的非天然氨基酸.

3 双荧光标记多肽探针

双荧光标记多肽探针是运用构成供体/受体对的两个基团标记而成. 其中一个称为荧光猝灭基团

(quencher); 另一个称为荧光发射基团, 即报告基团 (reporter). 当多肽完整时, 由于猝灭基团与报告基团空间相近, 表现出内部的荧光猝灭; 但猝灭基团与报告基团空间分离时, 报告基团就会释放出荧光, 因此称为荧光可激活多肽探针. 由于其原理类似于 Förster 共振能量转移 (FRET), 因此也可称为 FRET 肽探针. 双荧光基团组合有 Dabcyl/Edans、Mca/Dnp、Cy5/QSY21 和 DNP/DACIA 等. 双荧光标记多肽探针可用于各类能以多肽为底物的酶的检测、动力学和抑制剂的筛选研究.

3.1 切割型多肽探针

由于蛋白酶大多能特异性切割其底物多肽, 因此基于其底物多肽设计的切割型双荧光标记多肽探针在蛋白酶检测中应用广泛, 是最主要的荧光多肽探针类型. 其原理如图 2 所示, 蛋白酶使连接猝灭基团与报告基团的肽键断裂, 猝灭基团与报告基团分离, 报告基团发生荧光, 表明蛋白酶的存在.

周永列等^[12]建立了用双荧光标记多肽探针连续监测蛋白酶体活性的方法, 用特异性荧光多肽底物 Suc-LLVT-AMC、Z-VVA-AMC 和 Z-LLG-βNA (AMC 和 β-NA 为报告基团, AMC 即 7-氨基甲基香豆素) 分别测定蛋白酶体的糜凝乳蛋白酶样 (chymotrypsin-like)、胰蛋白酶样 (trypsin-like) 和肽基谷氨酰胺水解酶样 (PGPH-like) 的活性, 并研究其在筛选蛋白酶体抑制剂中的应用价值. Wan 等^[13]以邻氨基苯甲酸 (Abz) 为报告基团、2,4-二硝基苯基乙二胺 (Eddnp) 为荧光猝灭基团, 设计合成了双标记荧光多肽 H₂N-E(Eddnp)STLQSGLK(Abz)-CONH₂. 该多肽底物能被 SARS-CoV 3CL 蛋白酶识别, 并在 QS 之间被专一性酶解. 此荧光多肽底物可以作为荧光探针, 应用于 SARS-CoV

3CL 蛋白酶活性的测定及其抑制剂的筛选. Chevalier 等^[14]基于 Black Hole Quencher-3 (BHQ-3) 对偶氮染料具有很好的荧光猝灭作用, 建立了偶氮染料与 BHQ-3 体系, 用于检测肿瘤侵袭和转移中至关重要的蛋白酶——尿激酶型纤溶酶原激活因子. 日本的 Kondo 等^[15]以 MOCac 为荧光报告基团、2,4-二硝基苯 (Dnp) 为猝灭基团, 构建了荧光肽底物 MOCac-APAKFFRL-Dnp, 基于蛋白酶 A 能分裂 F-F (Phe-Phe) 键, 对啤酒中的蛋白酶 A 进行了准确、迅速的评价, 蛋白酶 A 的活力可以根据荧光强度进行评价. 凝血酶 (thrombin) 在凝血系统的许多疾病中发挥着关键性作用. Van Berkel 等^[16]基于荧光多肽检测凝血酶, 开发出一种新的凝血酶特异性荧光肽 Cbz-GGR-AMC, 其能够在凝血酶生成测试实验 (thrombin generation test, TGT) 中准确地测定凝血酶浓度. 由于蛋白酶是某些微生物的生物标记物, 有特异结合的底物多肽, 因此通过设计对微生物蛋白酶特异结合的底物多肽探针, 可以特异性地检测微生物. Kaman 等^[17]合成了炭疽芽孢杆菌蛋白酶的底物多肽, 其序列中含有 D-氨基酸, 不仅对炭疽芽孢杆菌的蛋白酶高度特异, 也适用于营养细胞和孢子, 提供了灵敏精确地检测芽孢子的方法, 在临床和生物防护应用中至关重要.

基质金属蛋白酶 (MMP) 在癌症、骨关节炎和类风湿性关节炎等病理条件下含量丰富. MMP 的生物检测为 MMP 相关疾病的诊断、预测和治疗监控提供重要的临床信息. Ryu 等^[18]利用荧光多肽探针固定化的诊断试剂盒“一步”检测 MMP. 通过将 MMP-13 专一性地由荧光基团 Cy5.5 和猝灭基团 BHQ-3 构成的荧光多肽固定化在 96 孔板上, 发展了一种高通量诊断试剂盒. 当 MMP 存在时, 荧光得以恢复, 对目标 MMP 具有很强的专一性, 其强度与 MMP 浓度成正比. 研究发现, 荧光强度与骨关节炎的发病情况直接相关, 此试剂盒也可用于 MMP 抑制剂效果的快速简便评价. Lee 等^[19]利用黑暗猝灭 (dark quenched) 荧光多肽检测了 MMP-13, 并用于骨关节炎发展的细胞内成像. Akers 等^[20]利用三股螺旋多肽光学探针检测细胞内 MMP-2 和 MMP-9 活性. 该探针以 3 股螺旋多肽为底物, 对 MMP-2 和 MMP-9 有很高的专一性. MMP-2 和 MMP-9 也称为明胶酶, 与肿瘤细胞入侵和肿瘤相关血管生成特异关联. 每个多肽股的中心是明胶酶敏感序列, 两翼经由 Lys 残基共缀 NIR 荧光染料. 当 3 股螺旋结构自组装后, 3 段多肽链互相缠缚,

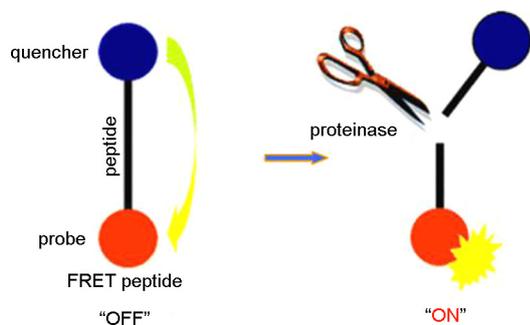


图 2 切割型多肽探针检测蛋白酶原理示意图

使荧光基团距离接近, 荧光猝灭; 而当酶切割 3 股螺旋肽后, 6 个标签多肽释放出来, 荧光信号增强. 荧光信号的增强受 MMP 抑制剂的抑制, 表明观察到的荧光信号是由酶介导的. Zhu 等^[21]设计了 c(RGDyK) 缀合的双功能受体靶向的荧光探针, 不仅用于肿瘤区域胞外 MMP 的检测, 同时也能测定 $\alpha V\beta 3$ 整合素. Zhu 等^[22]还首次利用 FRET 多肽检测了膜型基质金属蛋白酶(MT-MMP) (MMP-14) 的活性. 当用于体内检测时, 与靶向细胞外蛋白可溶型蛋白酶的荧光探针不同, 其荧光信号激活后会随血流而被清除掉, 而由 MT-MMP 激活的荧光信号, 能够维持清晰的信号长达 24 h. 这些发现将被广泛用于各种膜型蛋白酶的体内检测.

双荧光标记多肽也被用于特定蛋白质或蛋白质翻译后修饰的检测. Li 等^[23]利用由报告基团 Cy5.5 和猝灭基团 QSY21 组成的可激活近红外荧光多肽探针, 检测到成纤维细胞活化蛋白(FAP α). Vázquez 等^[24]通过镧系元素-多肽缀合物的分子间敏化反应检测磷酸化状态. 一段设计的多肽与配位不饱和镧的复合物, 其化学发光受序列中丝氨酸的磷酸化状态调控. 磷酸化状态时, 发光很弱, 而去除磷酸化后, 敏感基与金属络合, 产生强烈发光的超分子复合物. 运用荧光多肽实时检测蛋白酶已成为一种重要的方法^[25].

3.2 非切割型多肽探针

Thurley 等^[26]引入了一种新的探针概念, 设计了一种发夹型多肽信标(hairpin peptide beacons, HPB)作为检测蛋白质的探针, 如图 3 所示. 其中心是蛋白特异的多肽, 两侧是互补的肽核酸手臂, 两端用两个发色团分别标记. 当没有目标蛋白存在时, 其通过肽核酸互补形成稳定的发夹; 当目标蛋白与中心多肽特异相互作用后, 引起结构重组, 导致发夹打开, 使两端靠近的发色团分离, 产生荧光增强. 因此, 该方法可以检测蛋白质间相互作用, 可成功用 HPB 概念设计非切割型探针用于检测蛋白酶血管紧张肽原酶的

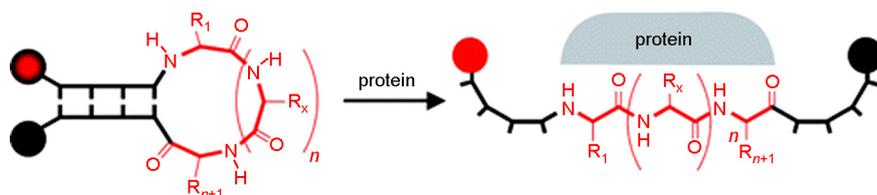


图 3 发夹型多肽信标检测蛋白质原理示意图^[26]

活性. 由于探针是非切割型的, 荧光信号可逆性使其可以连续监测蛋白酶活性的升高和降低.

3.3 LBP 型多肽探针

Vuojola 等^[27]通过基因编码将蛋白酶底物序列插入到绿色荧光蛋白(GFP)和能结合铽的镧系元素结合多肽(LBP)之间, 建立了蛋白酶的门控荧光检测方法. 结合铽的 LBP 与 GFP 以一段蛋白酶专一识别序列多肽连接构成 FRET 体系, 其在 280 nm 紫外光激发下, 发射 520 nm 发射光, LBP 发射光被猝灭; 而当底物受蛋白酶切割后, 结合铽的 LBP 发射出 545 nm 发射光, 如图 4 所示. 该体系被用来检测半胱氨酸蛋白酶(caspase)的活性. 镧系元素标记用作光子供体, 具有长的发射时间, 可以使用门控手段, 大大提高分析的灵敏度. 通过改变荧光蛋白和连接多肽的序列, 可以广泛用于蛋白酶活性的测定.

4 基于复合材料的多肽探针

发展杂化的检测和传递生物合成纳米材料对临床诊断和治疗至关重要. 纳米材料包括石墨烯、纳米金和量子点.

4.1 石墨烯复合多肽探针

石墨烯作为一种单原子厚二维的碳材料, 近年来引起了广泛的兴趣. 石墨烯或石墨烯氧化物对核酸和多肽等生物材料具有很大的吸附能力, 加之强大的荧光猝灭效率, 成为生物传感器发展的很好平台^[28]. Wang 等^[29]利用石墨烯氧化物-多肽缀合物检测细胞内蛋白酶-半胱氨酸蛋白酶-3 (caspase-3). 将石墨烯氧化物与多肽底物结合形成纳米共轭物. 石墨烯氧化物表面既固定了细胞穿透多肽 TAT, 又用 FAM 标记的 caspase-3 底物多肽 DEVD 修饰. 由于石墨烯氧化物的荧光猝灭效应, 形成的共轭物没有荧光; 而当 TAT 将石墨烯氧化物带入到细胞内后, 受

细胞内蛋白酶 caspase-3 降解, 荧光基团从石墨烯氧化物释放出来, 荧光强烈增强, 从而达到检测 caspase-3 的目的. Feng^[30]和 Ma 等^[31]分别将 FITC 标记的多肽固定化至石墨烯氧化物上, 简便灵敏地检测了 HeLa 细胞分泌出的 MMP2 (图 5)和蛋白酶解活性的前列腺特异抗原(PSA). Bhunia 等^[32]将作为酶底物的荧光多肽经过双层涂层 (interdigitated bilayer coating) 固定化至胶状的石墨烯上, 当酶切割多肽后产生荧光, 用以检测酶. Chen 等^[33]利用纳米尺度的石墨烯-多肽生物传感器, 对细胞表面的生物标记物进行实时特异检测. 将多肽 RGD 与芘和石墨烯构建纳米生物传感器, 检测癌细胞表面的凝集素 $\alpha v\beta 3$. 此方法具有简单、实用、灵敏和选择性高的特点, 同时也适用于其他标记物的检测, 如黏液素 1 (MUC1). MUC1 存在于上皮细胞恶性肿瘤中, 也是著名的肿瘤生物标记物. Pang 等^[34]利用基于石墨烯氧化物的荧光适体传感器荧光恢复检测 MUC1.

4.2 纳米金复合多肽探针

金纳米粒子具有优异的猝灭性能, 其表面修饰化学也不断发展成熟, 使纳米金复合多肽探针得到

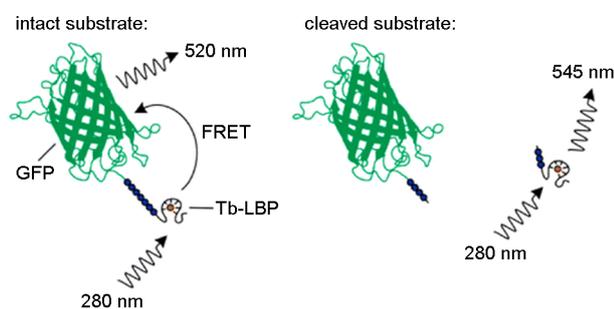


图 4 镧系元素结合多肽(LBP)检测蛋白酶原理示意图^[27]

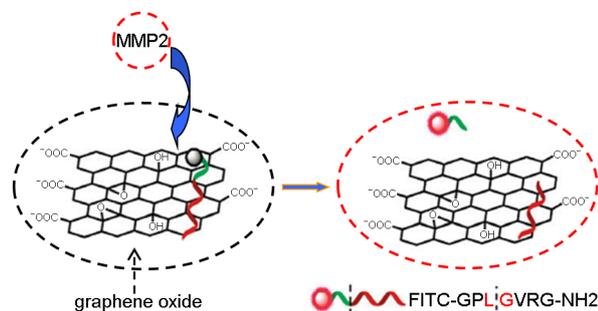


图 5 石墨烯氧化物复合的 FITC 标记多肽探针检测的示意图^[30]

大量应用^[35]. Sun 等^[36]将染料 Cy5.5 通过半胱氨酸蛋白酶专一的多肽 DEVD 固定在金纳米粒子表面, 构建了半胱氨酸蛋白酶敏感的纳米粒子, 用于细胞凋亡的检测. 由于金纳米粒子的荧光猝灭效应而不显荧光, 但当半胱氨酸蛋白酶作用后, 染料 Cy5.5 离开表面, 荧光得以迅速恢复, 如图 6 所示. 其可用于活细胞中半胱氨酸蛋白酶活性的实时监测, 具有简便高效的优点. Yi 等^[37]构建了基质金属蛋白酶敏感的金纳米棒, 用于检测基质金属蛋白酶. 将 Cy5.5 通过基质金属蛋白酶专一的多肽固定在金纳米棒表面, 当基质金属蛋白酶作用后, 染料 Cy5.5 离开表面, 在近红外激光照射下, 荧光得以迅速恢复, 并产生热量. 其可作为肿瘤的热疗试剂和肿瘤成像和治疗. 金纳米粒子在不同聚集状态下发光性能不同, 这一原理被应用到纳米金复合多肽探针的设计. Lee 等^[38]将蛋白酶专一的荧光多肽固定化在聚合纳米微粒上, 利用蛋白酶使其解聚而发生荧光来检测蛋白酶. Zhao 等^[39]用多肽包覆的金纳米粒子通过显色法灵敏、定量检测人血清中的溶菌酶. 多肽 CALNN 包覆的金纳米粒子能在溶菌酶的特异作用下聚集, 产生颜色变化. 通过优化条件, 线性响应范围为 1~25 ng/mL, 最低检测限为 80 pg/mL, 是目前检测限最低的检测方法. Hou 等^[40]利用点迹金纳米粒子免疫分析法检测生物素多肽, 能够达到 zeptomole (10^{-21} mol). 生物素与多肽共价连接, 并被吸附到硝酸纤维素膜上, 用抗体包覆的金纳米粒子与生物素多肽结合形成红点. Xie 等^[41]合成了复合纳米粒子, 大大提高了其功能. 利用花状 Au-Fe₃O₄ 纳米粒子作为模板, 在氧化铁和金的表面分别用 Cy5.5-GPLGVRG-TDOPA 和 SH-PEG5000 修饰构建了光学探针, 能够特异性地被肿瘤中 MMP 激活. 金纳米粒子具有优异的猝灭性能, 但体内表面

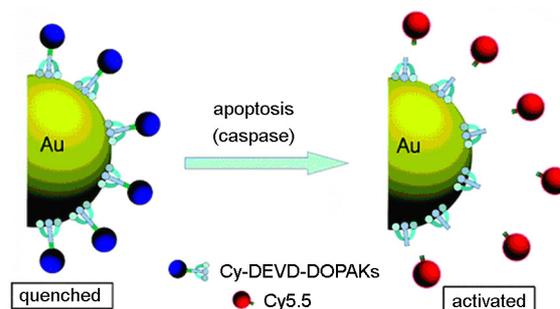


图 6 纳米金粒子复合多肽探针检测蛋白酶示意图^[36]

化学不稳定, 而氧化铁纳米粒子并非最佳的能量受体, 却提供了稳定的表面化学. 通过二者结合, 产生了一个整体结构, 具有两者独立成分所不能获得的性能, 能够进一步用于分子成像和治疗试剂.

4.3 量子点复合多肽探针

近年来, 量子点在生物医学领域的应用前景越来越多地引起科学工作者的广泛关注. 量子点与生物技术的结合, 极大地促进了生物领域的发展, 同时量子点自身性质的优化问题也引起人们的更加关注, 如增加量子点的水溶性及生物相容性、降低量子点的毒性等. 量子点复合多肽探针较好地满足了量子点性质优化的要求. Chen 等^[42]发展了 RGD 多肽修饰的近红外量子点, 如图 7 所示, 在氨基修饰的碲化镉量子点上引入 c(RGDyK), 能以凝集素为靶标进行红外光学成像, 显示活体动物体内癌细胞血管系统, 有助于癌症检测和成像指导的手术. 后来, Chen 等^[43]又发展了双功能探针, 在碲化镉量子点上引入 c(RGDyK) 的同时, 又引入螯合剂 DOTA (1,4,7,10-四氮杂环十二烷-*N,N',N'',N'''*-四乙酸), 由于 DOTA 能够螯合金属离子, 因此其既能用于肿瘤血管的正电子发射断层扫描(positron emission tomography, PET), 也能用于近红外荧光成像. Zhao 等^[44]基于多肽与量子点的相互作用, 构建了新型无标记荧光开光型生物传感器, 用于胰蛋白酶(trypsin)的检测. 设计的特异序列多肽能与量子点相互作用使量子点聚合而不发射荧光, 当受胰蛋白酶酶解后, 量子点分散开, 发生荧光, 此方法检测限达到 20 ng/mL. Xu 等^[45]将激酶底物多肽 CGGGLSARRL 与 CdTe 量子点缀合用于激酶活性的无标记评价. 未修饰多肽缀合的量子点发生聚集, 发出黄光, 而当激酶存在使底物多肽发生磷酸化后, 由于电荷的改变, 缀合量子点发生解聚分散, 发出绿光. 通过绿光强度测定可以测定激酶的活性. Liu 等^[46]则将量子点技术与基质辅助激光解析串联飞行时间质谱仪(MALDI-TOF-MS)结合, 首次提出直接可视化“目标点”策略, 大大提高了 MALDI-TOF-MS 检测多肽及其混合物或磷酸化多肽的灵敏度和可重复性.

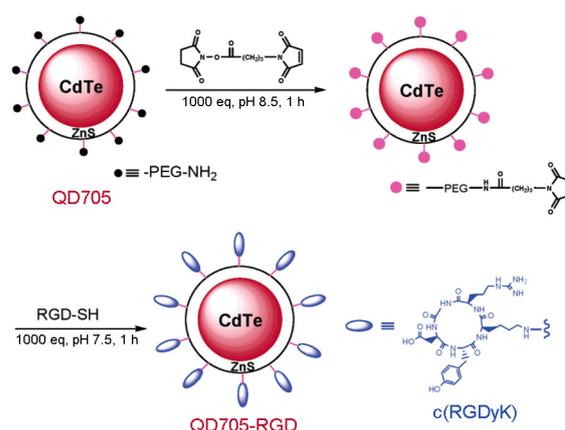


图 7 RGD 多肽修饰 CdTe 量子点的制备^[42]

5 展望

蛋白质的检测分为活体内与活体外检测. 对于活体外检测, 需要将蛋白质纯化后进行化学标记, 再纯化后使用一些侵害性方法(如显微注射^[47])将其引入活体细胞中. 然而, 此方法对蛋白质进行标记的同时也引入了人为干扰, 可能对蛋白质的功能产生一些不可消除的影响, 干扰细胞的正常功能. 在其自然状态下对蛋白质进行检测, 尽可能地减少人为影响, 才能最真实地反映蛋白质的分布和性质. 因此, 对蛋白质进行活体内检测是目前最重要的思路.

多肽作为检测探针, 相对于蛋白质、核酸等, 具有化学合成简便、容易标记、稳定性高和非特异吸附弱等优点. 随着新型荧光试剂、新型标记技术和新型复合材料的发展, 必将产生更多更新的荧光多肽探针, 对生物检测, 特别是蛋白质活体内检测将起到很大的推动作用. 多肽探针还面临着诸多挑战, 如特异性多肽的发现较难、基质材料的表面处理技术还不够成熟等, 对多肽探针的研究应主要集中在运用噬菌体展示技术和组合多肽化学加快特异性多肽的发现与筛选, 改进基质材料的表面处理技术. 未来的发展方向是将多肽探针发展成靶向性强、生物相容性好的生物成像探针、监测和治疗试剂.

参考文献

- 1 Khan SH, Ahmad F, Ahmad N, Flynn DC, Kumar R. Protein-protein interactions: Principles, techniques, and their potential role in newdrug development. *J Biomol Struct Dyn*, 2011, 28: 929-938
- 2 Lee S, Xie J, Chen XY. Peptides and peptide hormones for molecular imaging and disease diagnosis. *Chem Rev*, 2010, 110: 3087-3111

- 3 Lee S, Xie J, Chen XY. Peptide-based probes for targeted molecular imaging. *Biochemistry*, 2010, 49: 1364–1376
- 4 Varner JA, Cheresch DA. Integrins and cancer. *Curt Opin Cell Biol*, 1996, 8: 724–730
- 5 Ye Y, Bloch S, Xu B, Achilefu S. Design, synthesis, and evaluation of near infrared fluorescent multimeric RGD peptides for targeting tumors. *J Med Chem*, 2006, 49: 2268–75
- 6 Wu Y, Chen XY. RGD-Cy7 conjugates as near-infrared fluorescence probes to image $\alpha v\beta 3$ integrin expression in brain tumor xenografts. In: *Proceedings of the Nineteenth American Peptide Symposium*. New York: Springer, 2006. 714–715
- 7 Chen XY, Conti PS, Moats RA. *In vivo* near-infrared fluorescence imaging of integrin $\alpha v\beta 3$ in brain tumor xenografts. *Cancer Res*, 2004, 64: 8009–8014
- 8 Kurzawa L, Pellerano M, Coppolani JB, Morris MC. Fluorescent peptide biosensor for probing the relative abundance of cyclin-dependent kinases in living cells. *PLoS ONE*, 2011, 6: e26555
- 9 Reszka P, Schulz R, Methling K, Lalk M, Bednarski PJ. Synthesis, enzymatic evaluation, and docking studies of fluorogenic caspase 8 tetrapeptide substrates. *ChemMedChem*, 2010, 5: 103–117
- 10 Shi HB, Kwok RTK, Liu JZ, Xing BG, Tang BZ, Liu B. Real-time monitoring of cell apoptosis and drug screening using fluorescent light-up probe with aggregation-induced emission characteristics. *J Am Chem Soc*, 2012, 134: 17972–17981
- 11 Loving GS, Sainlos M, Imperiali B. Monitoring protein interactions and dynamics with solvatochromic fluorophores. *Trends Biotechnol*, 2010, 28: 73–83
- 12 周永列, 吕亚萍, 许武林, 胡惟孝. 连续荧光监测法测定蛋白酶体活性及其在筛选蛋白酶体抑制剂中的应用. *中国临床药理学与治疗学*, 2008, 13: 1127–1133
- 13 万惠新, 陈莉莉, 李欣, 王昕, 胡定宇, 沈旭, 沈竞康. 新型 SARS-CoV 3CL 蛋白酶荧光多肽底物的设计、制备及其酶动力学研究. *高等学校化学学报*, 2007, 28: 79–82
- 14 Chevalier A, Massif C, Renard PY, Romieu A. Bioconjugatable azo-based dark-quencher dyes: Synthesis and application to protease-activatable far-red fluorescent probes. *Chem-Eur J*, 2013, 19: 1686–1699
- 15 Kondo H, Yomo H, Furukubo S, Fukui N, Nakatani K, Kawasaki Y. Advanced method for measuring proteinase A in beer and application to brewing. *J I Brewing*, 1999, 105: 293–300
- 16 van Berkel SS, van der Lee B, van Delft FL, Wagenvoort R, Hemker HC, Rutjes FPJT. Fluorogenic peptide-based substrates for monitoring thrombin activity. *ChemMedChem*, 2012, 7: 606–617
- 17 Kaman WE, Hulst AG, van Alphen PTW, Roffel S, van der Schans MJ, Merkel T, van Belkum A, Bikker FJ. Peptide-based fluorescence resonance energy transfer protease substrates for the detection and diagnosis of *Bacillus* species. *Anal Chem*, 2011, 83: 2511–2517
- 18 Ryu JH, Lee A, Lee S, Ahn CH, Park JW, Leary JF, Park S, Kim K, Kwon IC, Youn IC, Choi K. “One-step” detection of matrix metalloproteinase activity using a fluorogenic peptide probe-immobilized diagnostic kit. *Bioconjugate Chem*, 2010, 21: 1378–1384
- 19 Lee S, Park K, Lee SY, Ryu JH, Park JW, Ahn HJ, Kwon IC, Youn IC, Kim K, Choi K. Dark quenched matrix metalloproteinase fluorogenic probe for imaging osteoarthritis development *in vivo*. *Bioconjugate Chem*, 2008, 19: 1743–1747
- 20 Akers WJ, Xu BG, Lee H, Sudlow GP, Fields GB, Achilefu S, Edwards WB. Detection of MMP-2 and MMP-9 activity *in vivo* with a triple-helical peptide optical probe. *Bioconjugate Chem*, 2012, 23: 656–663
- 21 Zhu L, Xie J, Swierczewska M, Zhang F, Lin X, Fang XX, Niu G, Lee S, Chen XY. Dual-functional, receptor-targeted fluorogenic probe for *in vivo* imaging of extracellular protease expressions. *Bioconjugate Chem*, 2011, 22: 1001–1005
- 22 Zhu L, Zhang F, Ma Y, Liu G, Kim K, Fang XX, Lee S, Chen XY. *In vivo* optical imaging of membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP) activity. *Mol Pharmaceutics*, 2011, 8: 2331–2338
- 23 Li JB, Chen K, Liu HG, Cheng K, Yang M, Zhang JP, Cheng JD, Zhang Y, Cheng Z. Activatable near-infrared fluorescent probe for *in vivo* imaging of fibroblast activation protein- α . *Bioconjugate Chem*, 2012, 23: 1704–1711
- 24 Pazos E, Goličnik M, Mascareñas JL, Vázquez ME. Detection of phosphorylation states by intermolecular sensitization of lanthanide-peptide conjugates. *Chem Commun*, 2012, 48: 9534–9536
- 25 González-Vera JA. Probing the kinome in real time with fluorescent peptides. *Chem Soc Rev*, 2012, 41: 1652–1664
- 26 Thurley S, Röglin L, Seitz O. Hairpin peptide beacon: Dual-labeled PNA-peptide-hybrids for protein detection. *J Am Chem Soc*, 2007, 129: 12693–12695
- 27 Vuojola J, Syrjänpää M, Lamminmäki U, Soukka T. Genetically encoded protease substrate based on lanthanide-binding peptide for time-gated fluorescence detection. *Anal Chem*, 2013, 85: 1367–1373
- 28 Ma HM, Wu D, Cui ZT, Li Y, Zhang Y, Du B, Wei Q. Graphene-based optical and electrochemical biosensors: A review. *Anal Lett*, 2013, 46: 1–17

- 29 Wang HB, Zhang Q, Chu X, Chen TT, Ge J, Yu RQ. Graphene oxide-peptide conjugate as an intracellular protease sensor for caspase-3 activation imaging in live cells. *Angew Chem Int Ed*, 2011, 50: 7065–7069
- 30 Feng D, Zhang YY, Feng TT, Shi W, Li XH, Ma HM. A graphene oxide-peptide fluorescence sensor tailor-made for simple and sensitive detection of matrix metalloproteinase 2. *Chem Commun*, 2011, 47: 10680–10682
- 31 Feng TT, Feng D, Shi W, Li XH, Ma HM. A graphene oxide-peptide fluorescence sensor for proteolytically active prostate-specific antigen. *Mol BioSyst*, 2012, 8: 1441–1445
- 32 Bhunia SK, Jana NR. Peptide-functionalized colloidal graphene via interdigitated bilayer coating and fluorescence turn-on detection of enzyme. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2011, 3: 3335–3341
- 33 Wang Z, Huang P, Bhirde A, Jin A, Ma Y, Niu G, Neamati N, Chen XY. A nanoscale graphene oxide-peptide biosensor for real-time specific biomarker detection on the cell surface. *Chem Commun*, 2012, 48: 9768–9770
- 34 He Y, Lin Y, Tang HW, Pang DW. A graphene oxide-based fluorescent aptasensor for the turn-on detection of epithelial tumor marker mucin 1. *Nanoscale*, 2012, 4: 2054–2059
- 35 Yeh YC, Creran B, Rotello VM. Gold nanoparticles: preparation, properties, and applications in bionanotechnology. *Nanoscale*, 2012, 4: 1871–1880
- 36 Sun IC, Lee S, Koo H, Kwon IC, Choi K, Ahn CH, Kim K. Caspase sensitive gold nanoparticle for apoptosis imaging in live cells. *Bioconjugate Chem*, 2010, 21: 1939–1942
- 37 Yi DK, Sun IC, Ryu JH, Koo H, Park CW, Youn IC, Choi K, Kwon IC, Kim K, Ahn CH. Matrix metalloproteinase sensitive gold nanorod for simultaneous bioimaging and photothermal therapy of cancer. *Bioconjugate Chem*, 2010, 21: 2173–2177
- 38 Lee S, Ryu JH, Park K, Lee A, Lee SY, Youn IC, Ahn CH, Yoon SM, Myung SJ, Moon DH, Chen XY, Choi K, Kwon IC, Kim K. Polymeric nanoparticle-based activatable near-infrared nanosensor for protease determination *in vivo*. *Nano Lett*, 2009, 9: 4412–4416
- 39 Huang H, Zhang QW, Luo JX, Zhao Y. Sensitive colorimetric detection of lysozyme in human serum using peptide-capped gold nanoparticles. *Anal methods*, 2012, 4: 3874–3878
- 40 Hou SY, Chen HK, Cheng HC, Huang CY. Development of zeptomole and attomolar detection sensitivity of biotin-peptide using a dot-blot gold nanoparticle immunoassay. *Anal Chem*, 2007, 79: 980–985
- 41 Xie J, Zhang F, Aronova M, Zhu L, Lin X, Quan QM, Liu G, Zhang GF, Choi KY, Kim K, Sun XL, Lee S, Sun SH, Leapman R, Chen XY. Manipulating the power of an additional phase: A flower-like Au-Fe₃O₄ optical nanosensor for imaging protease expressions *in vivo*. *ACS Nano*, 2011, 5: 3043–3051
- 42 Cai WB, Shin DW, Chen K, Gheysens O, Cao QZ, Wang SX, Gambhir SS, Chen XY. Peptide-labeled near-infrared quantum dots for imaging tumor vasculature in living subjects. *Nano Lett*, 2006, 6: 669–676
- 43 Cai WB, Chen K, Li ZB, Gambhir SS, Chen XY. Dual-function probe for PET and near-infrared fluorescence imaging of tumor vasculature. *J Nucl Med*, 2007, 48: 1862–1870
- 44 Zheng FF, Wu JF, Zhao GC. Peptide-quantum dot bioconjugates for label-free trypsin detection based on the exciton energy transfer. *Anal methods*, 2012, 4: 3932–3936
- 45 Xu XH, Liu X, Nie Z, Pan YL, Guo ML, Yao SZ. Label-free fluorescent detection of protein kinase activity based on the aggregation behavior of unmodified quantum dots. *Anal Chem*, 2011, 83: 52–59
- 46 Liu CW, Chien MW, Chen GF, Chen SY, Yu CS, Liao MY, Lai CC. Quantum dot enhancement of peptide detection by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal Chem*, 2011, 83: 6593–6600
- 47 Miller LW, Cornish VW. Selective chemical labeling of proteins in living cells. *Curr Opin Chem Biol*, 2005, 9: 56–61

Application of peptide-based fluorescent probes in protein detection

HUANG ZhiPing^{*}, TIAN XingTao, WU WeiHui, ZHANG Ming

Department of Biological and Chemical Defense, Institute of Chemical Defense, Beijing 102205, China

^{*}Corresponding author (email: hzp03@mails.tsinghua.edu.cn)

Abstract: Peptide-based fluorescent probe as a kind of fluorescent probes has been widely applied in tracing protein detection. The structure and detection principle of three main types of peptide-based fluorescent probes including mono-labelled peptide probe, dual-labelled peptide probe and composite peptide probe conjugated with other materials, as well as their applications in qualitative or quantitative protein detection and enzyme activities evaluation were reviewed. The future development of peptide-based fluorescent probes was highlighted.

Keywords: peptide, fluorescent probe, protein, detection