科学通报 2013 年 第 58 卷 第 28-29 期：2872 ~ 2885
专题：活细胞大分子的定位和定量问题 评 述 www.scichina.com csb.scichina.com
《中国科学》杂志社 SCIENCE CHINA PRESS

适用于荧光成像的化学发色团与生物正交反应研究进展

张艳[①], 陈鹏[②], 姚祝军[①*]

① 南京大学化学化工学院, 南京 210093;
② 北京大学化学与分子工程学院, 北京 100871
* 联系人, E-mail: yaoz@nju.edu.cn

2013-02-27 收稿, 2013-04-24 接受
国家重点基础研究发展计划(2010CB833202)和国家自然科学基金(91213303)资助

摘要 荧光成像是一种融合多门现代学科的显像方法, 其运用荧光成像探针实现对细胞及动物体内的生物大分子的动态、可视化观察, 为疾病的诊断与治疗提供了有力的方法. 理想的荧光发色团和细胞环境友好的生物正交反应是构建性能优良的活细胞荧光成像探针的两大因素, 本综述总结了近年来在荧光发色团及生物正交反应方面最新的研究进展.

关键词
荧光成像
生物大分子
荧光发色团
生物正交反应
定量生物学

荧光成像是融合了有机化学、光化学、生命科学等学科为一体的显像方法, 其运用光化学原理, 结合现代有机合成技术, 设计和构建荧光功能分子, 建立和发展细胞及动物体内的荧光成像方法, 实现了对生物大分子的原位、实时、动态研究, 为揭示生物机制、诊断与治疗疾病提供了有力的方法; 这一领域凸显了现代多学科交叉的典型特点. 这些研究中, 针对具有重要生物学意义的大分子目标进行合理的标记方案设计并通过实验获得真实可靠的成像信息是十分关键的. 为此, 两个方面的保证是必需的: 第一, 作为 “报告者”的荧光发色团的化学和光学性质在实验体系下足够优秀; 第二, 获得的数据(往往是化学变化导致的光学性质改变)能够真实反映生物大分子定位和定量的变化信息. 为了保证后者不为实验环境等背景因素所干扰, 实验荧光探针(分子装置)和研究目标之间必须能专一性地相互识别. 生物正交反应是指能够在生物体内的生理环境中发生, 与其中的各种反应互不干扰, 不会受到其中各种生物分子的影响, 并且也不会对生物体或目标生物分子造成损害的一类化学反应. 这类化学反应的发展能够使我们在分子尺度上修饰、标记和改造生物大分子, 并由此探索细胞信号传导路径, 揭示疾病发病机理, 了解生命过程机制. 生物正交反应最终将会实现对各种活体生物的生理过程进行调控, 并对人类疾病的预防和治疗产生深远影响. 将荧光发色团与能够发生生物正交反应的官能团相结合, 即可利用生物正交反应实现对细胞内特定靶标分子的荧光标记与成像, 相关的研究为当前化学生物学领域的前沿与热点. 本文将结合实例从荧光发色团与生物正交反应两方面综述最新的研究进展.

1 荧光发色团

为了适用于生物成像的需要, 化学发色团通常需要满足以下条件: (1) 荧光分子具有较好的水溶性和生物兼容性; (2) 对细胞具有较好的穿透性, 容易进入细胞; (3) 激发波长和发射波长处于可见或近红外区, 以具有较好的组织穿透性和避免较高的激发能量破坏生物体的生理结构. 目前常用于荧光成像

引用格式: 张艳, 陈鹏, 姚祝军. 适用于荧光成像的化学发色团与生物正交反应研究进展. 科学通报, 2013, 58: 2872–2885
Zhang Y, Chen P R, Yao Z J. Recent progress on the development of probes for fluorescent imaging and bio-orthogonal reactions (in Chinese). Chin Sci Bull (Chin Ver), 2013, 58: 2872–2885, doi: 10.1360/972013-232

的发色团主要分为 3 类: (1) 基于有机小分子的发色团如香豆素、荧光素、罗丹明、BODIPY 和箐染料等; (2) 基于纳米材料的发色团如量子点、上转换纳米颗粒等; (3) 生物大分子类荧光成像材料, 如绿色荧光蛋白、红色荧光蛋白等. 这些荧光发色团和成像物质的发展为科学家们了解生命体系的复杂过程提供了有效的工具. 本部分将简要介绍这 3 类荧光标记物的性质、应用及与此相关的最新研究工作报道.

1.1 有机小分子发色团

在数码时代彩色胶片市场日渐衰退的背景下, 有机染料在影像技术领域又迎来了新的蓬勃发展. 有机小分子发色团因其结构容易修饰, 因此应用最为广泛. 通过修饰, 基于香豆素、荧光素、罗丹明、BODIPY 和箐染料已经发展出了一系列的荧光发色团, 其大多水溶性和生物兼容性较好, 波长和性能通过结构修饰可调, 已经被广泛发展成各种类型的荧光探针并应用到对各种生物分子的成像之中. 如香豆素(coumarin)即是一类存在于植物界中的香豆素类化合物的母核(图 1(a)), 通过修饰其已经被发展成多种针对不同生物分子的荧光探针. 锌离子(Zn^{2+})是神经系统中的一个重要的金属离子, 其与许多的神经疾病如阿尔茨海默病和癫痫等都密切相关, 因此 Komatsu 等人[1]针对 Zn^{2+}设计了一个基于香豆素的比例计量型荧光探针(图 1(b)). 该探针的最大吸收波长处于 500 nm 左右, 最大发射波长处于 550 nm 左右, 在与 Zn^{2+}结合后, 其发射波长发生变化, 558 nm 的发射增加而 543 nm 的发射降低, 因此可以用于对 Zn^{2+}的比例测量; 其也已经被应用到对细胞及海马体组织中的 Zn^{2+}检测. 双氧水(H_2O_2)分子也是生物体中一种重要的生物分子, 与许多重要的生理疾病紧密相关. Du 等人[2]则设计了一种以香豆素为基础的激活型荧光探针(图 1(c)), 该探针的最大吸收波长为 400 nm 左右, 而最大发射波长为 480 nm 左右, 且该探针在与 H_2O_2 作用后荧光可以增强 5 倍左右. 为了研究抗生素类药物与细菌 RNA 间的作用, Xie 等人[3]设计了一种以香豆素为基础的荧光共振能量转移(FRET)型荧光探针(图1(d)). 该香豆素发色团吸收波长为 400 nm 左右, 发射波长为 480 nm 左右, 再结合发射波长处于 400 nm 左右的尿嘧啶碱基, 分别将这两个发色团接入抗生素和细菌 RNA 中, 即可实现对两者之间作用的检测.

作为合成有机化合物, 荧光素(fluorescein, 图 2(a))在蓝光或紫外光照射下可以发出绿色的荧光, 是目前应用非常广泛的荧光发色团之一. Li 等人[4]就以荧光素为基础设计了一种可以对组氨酸进行标记

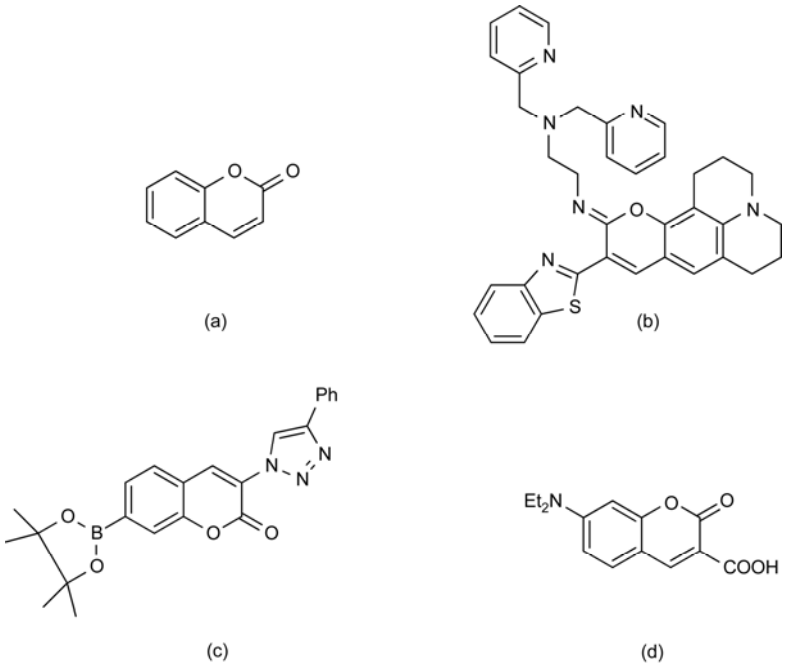

图 1 香豆素类型发色团及荧光探针

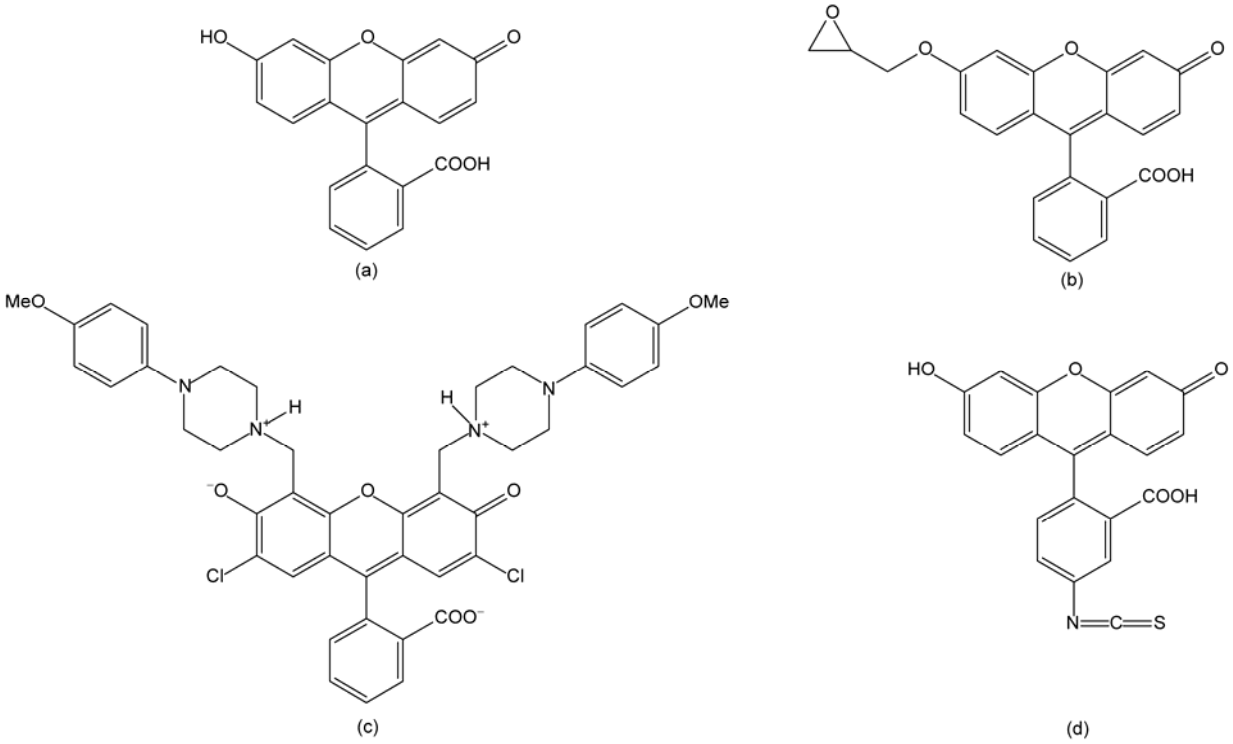

图 2 荧光素类发色团及荧光探针

的荧光探针(图 2(b)). 该探针的最大吸收在 480 nm 左右, 最大发射在 520 nm 左右, 且在与组氨酸作用后, 荧光增强; 其也已经被成功用于对人血清中的组氨酸进行标记. 利用光诱导的电子转移机制(PET), Sparano 等人[5]设计了一种自淬灭型的荧光探针(图 2(c)). 该探针在与 RNA 作用后, 其 PET 过程会被破坏, 因此荧光得以恢复. 在荧光素中, 还有一类应用最广泛的且已经商业化的发色团, 即异硫氰酸荧光素(FITC, 图 2(d)), 已经被广泛应用于对 RNA, DNA, 蛋白和细胞的标记中[6,7].

罗丹明(rhodamine)是指一系列相关的萤光酮杂环化合物(图 3(a)), 其结构与荧光素类似, 但波长相对较长, 最大发射波长可以达到 600 nm 左右. 同样利用 PET 机制, Nagano 课题组[8]设计了一种可以靶向细胞中的活性氧(ROS)的自淬灭型荧光探针(图 3(b)). 该探针只有在遇到 ROS 时才会产生荧光, 具有很好的灵敏性和选择性, 而且其也被证实可以在细胞的线粒体中对 ROS 进行成像. 类似地, 同样对 RSH 有着很好的灵敏性和选择性的探针(图 3(c))可靶向细胞中的活性巯基分子(RSH)产生荧光并已被成功用于对细胞的成像中. 近来 Nagano 课题组[9]报道了另外一种对次氯酸(HOCl)敏感的且发射波长处于近红外区的罗丹明荧光探针(图 3(d)). 该探针在与 HOCl 作用后, 五元环将打开, 荧光得以恢复. 该探针对 HOCl 有着极好的选择性和敏感性, 且在细胞和动物体内均表现出了较好的成像能力.

氟硼二吡咯(BODIPY)是另外一种常用的有机发色团(图 4(a)), 其通常发红光且水溶性较好, 因此应用比较广泛. 目前, 在 BODIPY 的基础上已经发展出了一系列水溶性更好且波长更长的发色团, 并根据其自身性质也已经得到了针对不同生物分子的荧光探针. Akkaya 课题组[10]设计了一种针对生物巯基分子的荧光探针(图 4(b)), 该探针的发射波长可以达到 660 nm 左右, 并且其自身带有聚乙二醇结构, 具有很好的水溶性, 适于生物体系检测. 该探针利用 PET 机制, 本身荧光处于淬灭状态, 在遇到硫基分子后, 荧光显著增强. Han 课题组[11]设计了一种同时对 HOCl 和硫化氢(H_2S)生物分子有响应的荧光探针(图 4(c)), 该探针同样基于 PET 机制, 在与 HOCl 作用后, 荧光显著增强; 而在与 H_2S 作用后, 探针又回到原始状态, 荧光减弱. 体外实验证实该荧光探针对两种生物分子均有很好的选择性和敏感性, 细胞实验也证

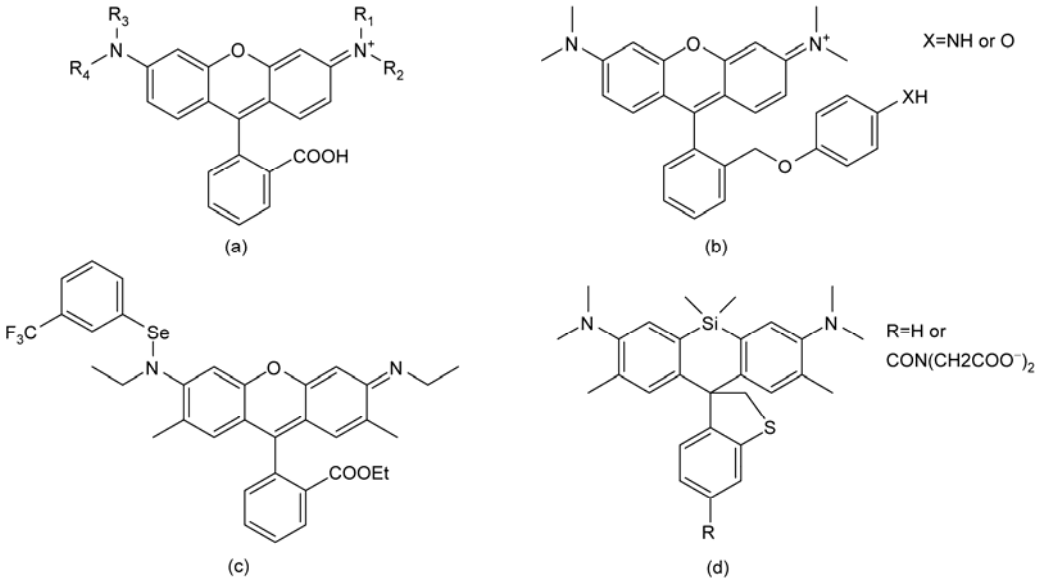

图 3　罗丹明类发色团及荧光探针

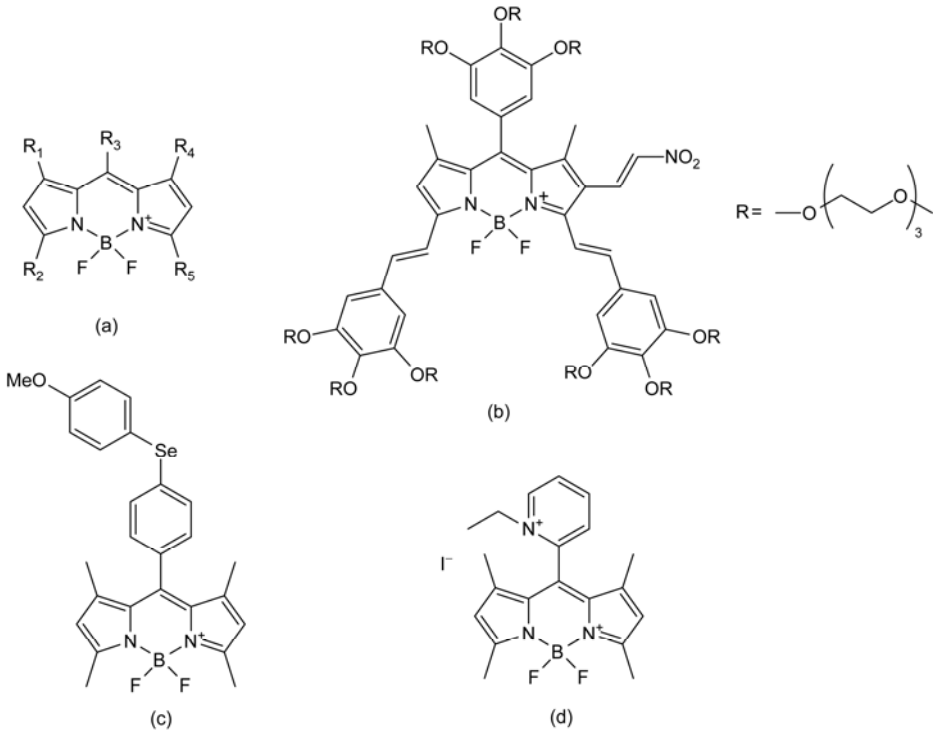

图 4　BODIPY 类发色团及荧光探针

实该探针具有很好的细胞膜通透性，而且可以连续对两种生物分子进行检测. 最近，大连理工大学彭孝军课题组[12]报道了一种基于 BODIPY 的、可以用作线粒体染色的荧光发色团(图 4(d)). 该发色团毒性小且稳定性较高，适用于长时间显影，其在线粒体标记中显示出了比商业化线粒体染色剂更好的潜力.

箐染料(Cyanine)是指发色团共轭体系两端建立在 N-N 原子间的脒离子插烯物(图 5(a))，其分子可修饰性强，吸收和发射波长较长，可以达到近红外区，且量子产率较高，因此相比其他有机分子染料，箐染

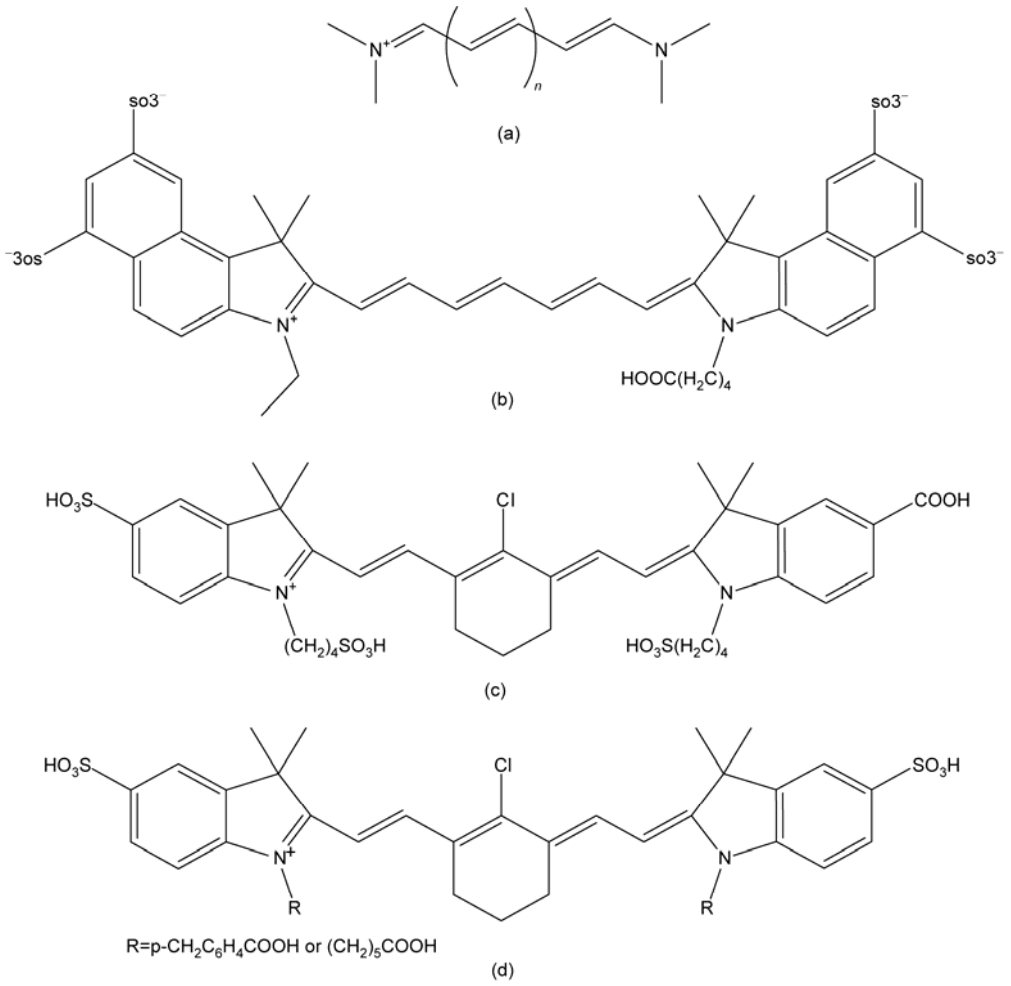

图 5 菁染料类发色团

料最适于体内显影. 其中有不少菁染料已经商业化, 如 Cy5.5(图 5(b)), 这些染料已经被运用于构建各种荧光探针并用于体内显影中[13,14]. 如 Pham 等人[15]合成了一种相比于传统菁染料稳定性更高、水溶性好且发射波长可以达到 800 nm 左右的近红外菁染料(图 5(c)), 该发色团可用于靶向癌症抗原的多肽标记并成功用于活体显影中. 彭孝军课题组[16,17]也设计合成了一系列的菁染料(图 5(d)), 这些菁染料的发射波长都处于 800 nm 左右, 量子产率较高.

1.2 纳米材料发色团

由于有机小分子发色团量子产率相对较低, 并不能完全满足体内显影的光强度需求. 随着纳米技术的发展, 量子点(QDs)以其较好的荧光性质吸引了科学家们的视线. 相比于有机小分子发色团, 量子点具有宽吸收、窄发射、高量子产率、优越稳定性和长荧光寿命等特性. 另外, 量子点在体内的循环时间较长, 适于体内显影. 这些优点, 使得量子点已经发展成为一种广泛用于生物成像中的荧光发色团. 目前应用比较广泛的量子点大都是拥有核-壳结构的无机纳米材料(CdSe@ZnS, 图 6), 再通过对其表面进行修饰使其带有羧基或者氨基以用于与其他生物分子相连.

通过将靶向整合素的短肽 RGD 接到量子点表面, 量子点可以用于肿瘤血管靶向的体内成像[18]. 而将荧光素蛋白连接到量子点表面后, 可以实现生物荧光共振能量转移(BRET), 并已成功用于体内成像中[19,20]. 另外将量子点作为 FRET 中发色团的一种, 也已经实现了对各种蛋白酶的成像[21]. 这些例子都说明了将量子点作为发色团并用于体外、体内成像中

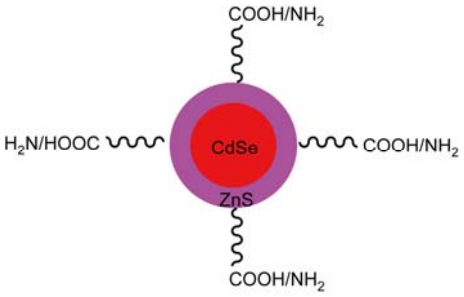

图 6　量子点类发色团的基本结构示意图

的潜力.

有机小分子发色团及量子点均属于常规荧光发色团, 均由短波激发, 发射长波. 然而短波长的光在体内组织穿透性较差, 而且生物体内的很多大分子在短波激发下会产生自身荧光, 造成背景信号较深. 与此相对, 近红外光作为光源则可以规避这些缺点. 近几年, 拥有可以用近红光激发和发射紫外或近红外荧光特性的新型纳米材料-基于稀土元素的上转换纳米颗粒(upconversion nanoparticles)越来越引起人们的重视. 该纳米材料同样拥有核-壳结构, 目前最常用的结构为 $NaYF_4$ (Yb, Er, Tm)@ $NaYF_4$ (图 7). 其原理基于其中相邻原子的能级轨道比较接近, 在激发光的激发下, 电子会从两个原子间的能级中连续跳跃, 从而得到更高的能量[22]. 在电子回到基态时, 则产生波长更短的紫外光或近红外光. 目前常用的上转换纳米颗粒的激发波长为 980 nm, 而发射波长根据掺杂的稀土原子不同或比例不同可以从紫外光变化到近红外光.

由于其独特的光学性质, 上转换纳米颗粒已经被广泛应用于生物成像中. 可以发射 800 nm 左右近红外荧光的上转换纳米颗粒在 2008 年首次被应用于

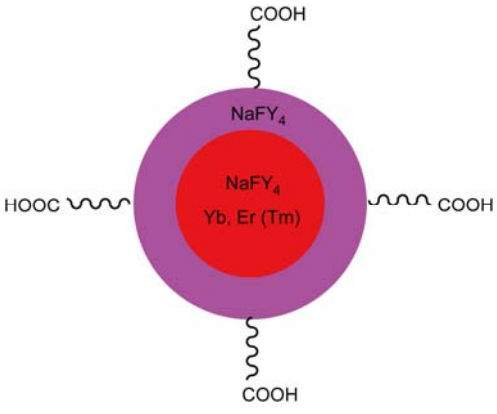

图 7　上转换纳米颗粒类发色团

体内成像中, 并且成像结果也显示其在体内成像上的巨大优势[23]. 随后, 掺杂其他稀土金属原子或者利用聚合物制得的上转换纳米颗粒均被证实可以用于体内成像中, 且信噪比较高[24,25]. 在接上具有靶向功能的叶酸分子后, 该类发色团呈现优良的成像性能[26].

上述的两种纳米发色团相比于有机小分子发色团, 均表现出了较强的体内成像能力. 但其均由重金属组成, 在生物应用方面的毒性问题将会给其进一步应用蒙上阴影, 未来在优化其结构和生物兼容性方面仍需科学家继续努力.

1.3　生物大分子荧光物质

荧光蛋白的应用在某种程度上可以说是革新了现代生物学的研究面貌. 利用荧光蛋白可以观察细胞活动和标记表达蛋白. 由于其较好的生物兼容性, 荧光蛋白作为荧光发色材料的一种, 在生物成像中具有广泛而重要的用途, 例如使科学家们可以实现实时观测肿瘤细胞的生长、入侵、转移和新生.

最早出现的绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)[27,28]是在水母中发现的, 其单体蛋白质由 238 个氨基酸组成, 分子量约为 27 kD, 在光激发下可以发出绿色的荧光. GFP 的发光不需要辅助因子, 不需要额外酶的参与, 只需要氧气的参与, 就可以通过氨基酸之间的反应发出绿色的荧光. Shimomura, Chalfie 和 Tsien 因在 GFP 研究中的突出贡献一起获得 2008 年诺贝尔奖. 随着这一领域的发展, 通过生物工程的手段, 科学家们也得到了 GFP 的各种变种, 包括增强绿色荧光蛋白、蓝色荧光蛋白、黄色荧光蛋白和红色荧光蛋白等. 其中增强绿色荧光蛋白是水母荧光蛋白中亮度和稳定性最好的一种荧光蛋白[29]. 然而短波长的荧光蛋白并不能帮助对生物体深层的组织进行成像, 随着对远红外荧光蛋白的不断研究, Shcherbo 等人[30]成功获得了发射波长处于 635 nm 的红色荧光蛋白. 该蛋白的出现将大大提高生物体活体成像的质量, 并在实时追踪活生物体内深层组织的分子活动上得到广泛的应用.

由于荧光蛋白具有各种优点, 如易于构建, 可通过生物工程方法导入活细胞之中进行活细胞的标记和成像; 在不同的生物体系中具有通用性和兼容性, 各种变种荧光蛋白已经广泛应用于基因表达的报告体系中[31], 也包括 pH、小分子、酶等成分的成像以

及蛋白间的相互作用检测等[32,33]. 例如, 利用 FRET 原理进行成像, 将荧光蛋白作为荧光给体或受体, 检测对象可以影响给体和受体之间的距离从而影响其荧光信号. 这一手段在蛋白酶的检测中得到了成功应用, 两个荧光蛋白被一段可以被相应蛋白酶切割的肽链相连, 在蛋白酶作用后, 荧光则会发生变化[34]. 另外一种手段是基于检测对象可以影响荧光蛋白的构型, 从而影响其产生的荧光. 近来产生的一类全新的检测策略, 是将荧光蛋白分成两部分, 检测对像的存在使两部分组合成整体从而发出荧光. 该手段已经被应用到蛋白相互作用的检测中[35]. 而对 pH 的检测主要有两种手段, 一种是基于荧光蛋白的荧光光谱在不同 pH 下的变化, 另外一种是基于由一种不受酸性条件影响的荧光蛋白和另一种可对酸性条件响应的荧光蛋白组成的比例荧光变化[36,37]. 这些荧光蛋白的应用, 极大地拓宽了生物领域的研究, 也极大地促进了化学生物学成像领域的发展.

上述 3 类荧光发色物质各自具有优缺点, 针对不同的生物成像靶标选择不同的发色团或者将其组合进行生物成像是目前的前沿研究热点. 利用这些发色团进行生物成像, 将显著地帮助科学家们对生物体内各种生物分子进行实时、动态的研究. 以 GFP 为代表的大分子发色团可以直接运用生物工程的手段导入, 对于生物学研究者来说使用方便, 但是由于其大小和研究目标不相上下, 存在干扰研究目标的较大可能性, 这是它们的缺陷.

2 生物正交反应

生物正交反应是指能够在活体细胞内进行的化学反应[38], 它们能够在生物体内的生理环境中发生, 与其中的各种反应互不干扰, 不会受到其中各种生物分子的影响, 并且也不会对生物体或目标生物分子造成损害. 因生命过程与生物分子的复杂性和脆弱性, 生物正交反应的开发也具有相当大的挑战性, 具体表现在: (1) 活泼的亲核性及还原性有机基团, 如羟基、氨基、巯基和羧基等在生物体系和生物分子中也大量存在; (2) 生物正交反应的发生需要相对温和的条件, 因为生物体系与生物分子通常只能在中性、常温、水相溶液等环境下存在; (3) 生物体系中存在多种不同的生物大小分子, 并且每一种生物分子的浓度都非常低(一般为 10^{-9}~10^{-3} mol/L)[39]. 这些对生物正交反应的限制条件使得传统的有机化学反应难以在生物体系中得到应用. 因此, 发展适用于研究生物体系和生物分子的生物正交反应, 使其能够在生理环境下以高速率与高选择性进行, 是当前化学、生物与医学交叉领域急需解决的瓶颈问题, 并越来越受到人们的重视. 生物正交反应能够将有机小分子标记物(如荧光染料和生物素)和生物大分子有效地偶联在一起, 从而用于对生物大分子及其参与的生命活动进行可视化观察. 目前常用的生物正交反应主要分为 3 类: 金属催化反应、光催化反应和无需催化剂的反应, 我们将逐一介绍这 3 类反应及其最近的一些发展.

2.1 金属催化剂催化的生物正交反应

生物正交反应必须通过各种化学官能团之间的相互作用实现, 而在这类反应中效率最高、运用最广泛的是在亚铜盐催化下发生在叠氮与炔键之间的点击化学反应(click reaction, 图 8(a)). 这一反应在生物领域的应用最早由 2001 年诺贝尔化学奖得主 Barry Sharpless 教授[40]首先提出, 是一项用于对生物大分子进行标记的革命性技术. 点击化学反应可以有效地对大肠杆菌和酵母中的蛋白进行标记[41,42], 也已被用来对体内的蛋白进行标记和分析[43]. 虽然点击

表 1 各类荧光发色团的主要特性及优缺点

荧光发色团		特性及优点	缺点
有机小分子发色团		分子较小、容易获得及修饰、光谱范围较宽(紫外区至近红外区)	易被光漂白、斯托克斯位移较小、量子产率较低
纳米材料发色团	量子点	吸收及发射通过大小变化可调、耐光性强、吸收范围宽、量子产率高、斯托克斯位移较大	尺寸较大、毒性较大、稳定性不高
	上转换纳米颗粒	激发波长处于近红外区、发射波长通过大小或稀土原子掺杂可调(紫外区至近红外区)	尺寸较大、毒性较大、量子产率较低
生物大分子荧光物质		生物兼容性好、可通过生物工程的方式对活细胞或活体内特定生物分子进行标记成像	易被光漂白、斯托克斯位移较小、尺寸大、易对目标生物大分子产生干扰

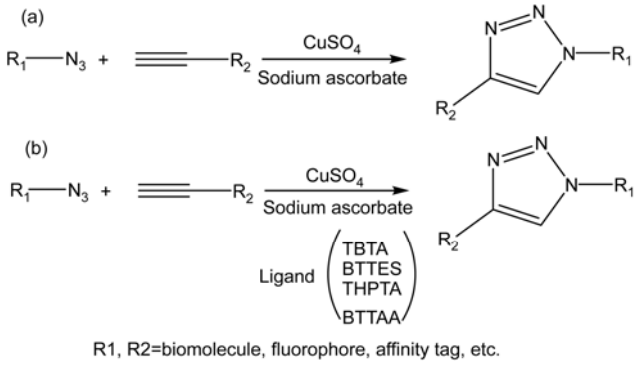

图 8　点击化学反应示意图

化学反应在化学生物学研究方面的应用已经得以证实，但由于其需要用到有毒的一价铜离子，因此其本身不具有生物兼容性. 为了改善这一缺陷，化学家们开始寻找能够降低一价铜毒性的配体，这类配体的发展极为迅速，目前已经发展出了几类能够用于无(低)毒点击化学的配体[44](图 8(b)). 这一新方法也已经被证实可以在活细胞表面进行标记[45,46].

末端炔则可以在钯催化的条件下与碘代芳基间发生 Csp^3-Csp^2 偶联反应(sonogashira reaction，图 9(a))，这一反应也已经被成功拓展到化学生物学领域. 在钯与配体 TPPTS 的共同作用下，这一反应成功地在体外蛋白上标记上了生物素[47]. 而随着对配体的进一步优化和筛选，纽约州立大学 Buffalo 分校 Lin 课题组[48]发现一类新的配体 DAP 可以显著地改善这一反应的反应速率和产率，使其可以在生理环境下进行，随后这一反应也成功地对大肠杆菌细胞进行了荧光标记. 除此之外，碘代芳基与二羟基硼基之间的 Suzuki-Miyaura 偶联反应也被发展成一种新型的生物正交反应(图 9(b)). 这一反应在钯与配体 DBA 的共同催化下可以用来对 Z 端蛋白进行荧光标记[49]，随着对配体的进一步优化，ADHP 配体被发现可以显著地改善这一反应，使其可以在生理条件下进行，并已经成功地对体外蛋白和细胞膜表面的蛋白进行荧光标记[50,51]. 虽然钯催化的偶联反应已经被成功发展成为一种新型的生物正交反应，但是其所用的钯催化剂的毒性和细胞通透性仍然限制了其的生物学应用，因此发展更加高效的新配体以进一步降低金属催化剂的浓度仍是目前急需解决的问题.

2.2　光催化的生物正交反应

除了这些需要额外金属催化剂的生物正交反应以外，另外一类只需以光为催化剂的光点击化学反应(photoclick reaction)以其反应简单、迅速、产物单一的特性也被发展成为了一类新型的生物正交反应(图 10). 这一反应发生在四氮唑和双键之间，四氮唑在紫外光照射下，可以迅速产生 1,3-偶极子并与双键进行加成. 这一光点击反应已成功用来对绿色荧光蛋白进行标记[52]，由于其反应产生的产物自身带有荧光，因此其不仅可以作为一种连接方法，也可作

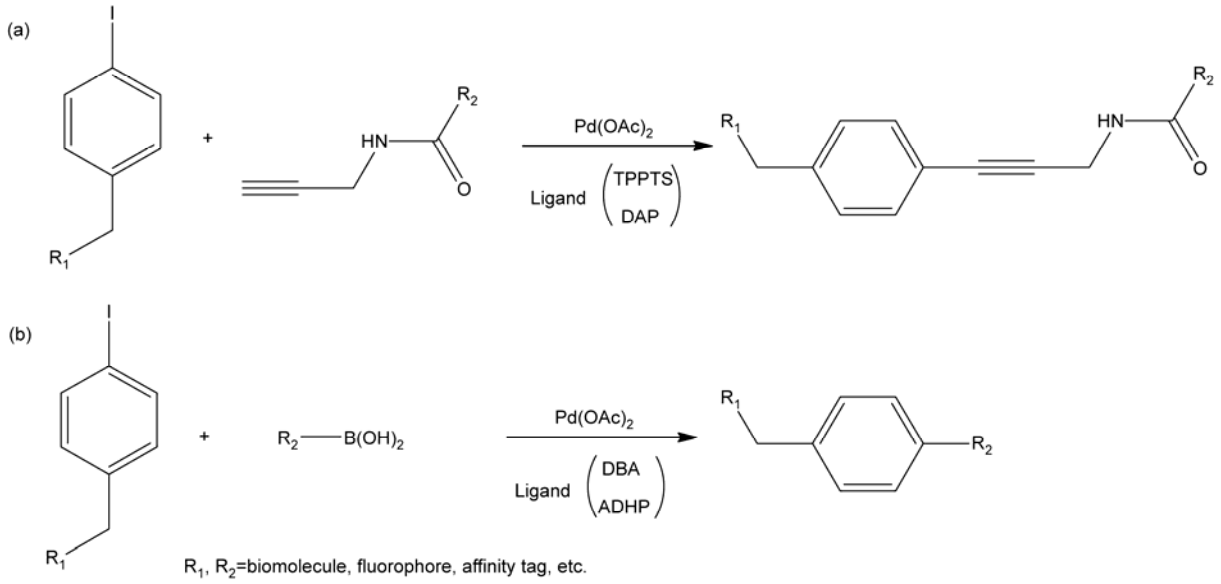

图 9　钯催化的生物正交反应

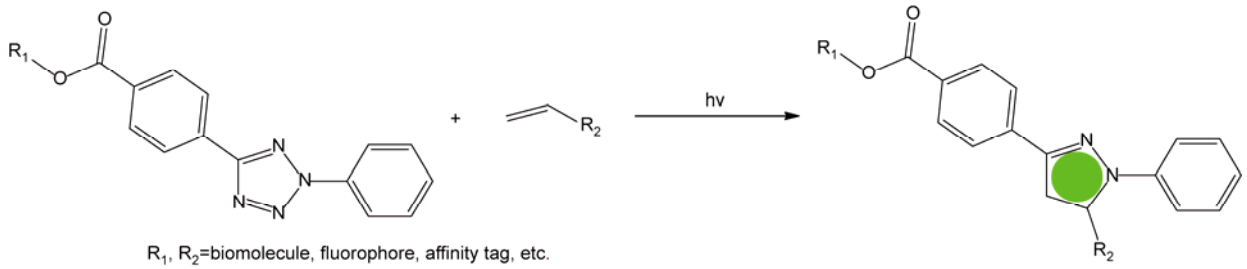

图 10　光点击化学反应

为一种标记方法. Lin 课题组[53]成功地将 photoclick 反应运用到了在大肠杆菌中对修饰上烯烃的蛋白进行标记.

2.3　无需催化剂的生物正交反应

由于点击化学反应中一价铜的毒性问题, 美国加州大学伯克利分校 Bertozzi 课题组[54]提出了通过八元环诱导的环张力来活化炔基, 实现了无铜点击化学(图 11). 这一改进版的点击化学反应已经被证实可以对细胞膜表面的生物蛋白进行标记[55], 也被应用于细胞表面和细胞中的多糖示踪. 然而近来有越来越多的报道说明这一方法得到的炔键不够稳定, 会和生物体内蛋白上的半胱氨酸的巯基侧链发生反应, 从而造成很高的背景, 进而限制了其在生物体内的应用.

而叠氮基团也被发现可以与带有膦基的酯发生施陶丁格反应(staudinger reaction, 图 12), 这也是一类经典的无需催化的生物正交反应[56], 这一反应同样可以在活细胞膜的表面引入标记基团[57].

利用环双键与四嗪(tetrazine)之间的强反应性能, 特拉华大学 Fox 教授课题组[58]也将狄尔斯-阿尔德反应(Diels-Alder reaction)发展成为了一种生物正交反应(图 13(a)). 这种反式电子需求的狄尔斯-阿尔德反应反应迅速, 产物单一, 而副产物为氮气, 因此也是一种理想的生物正交反应. 这一反应已经被成功用于对硫氧还蛋白(thioredoxin)进行修饰. 随后, 哈佛大学的 Hilderbrand 课题组[59]又将这一反应进行优化, 得到反应速度更快的方法, 并成功地将这一反应用于对活细胞的选择性荧光标记中. 与此同时, 四嗪与桥环烯烃的狄尔斯-阿尔德反应(图 13(b))也被用于生物体系的标记中, 其被用来对血清和细胞中的抗体蛋白进行荧光标记[60]. 而四嗪与环丙烯之间的加成反应(图 13(c))也被应用于对活细胞中的蛋白进行荧光标记和分析[61].

以上叙述的生物正交反应均必须通过各种化学官能团之间的相互作用才能实现, 而这些官能团的生物正交性是保证这些化学反应在生物体内正交进行的基础, 也就是要求这些化学官能团必须和生物

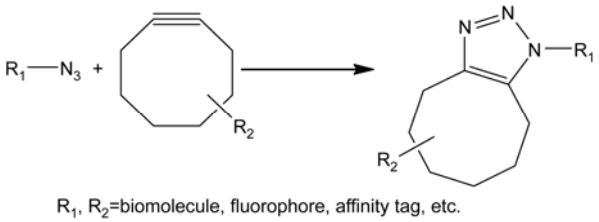

图 11　无铜点击化学反应

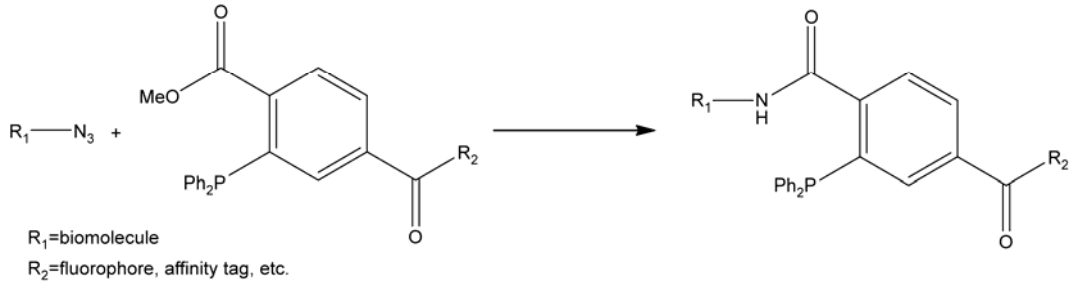

图 12　施陶丁格反应示意图

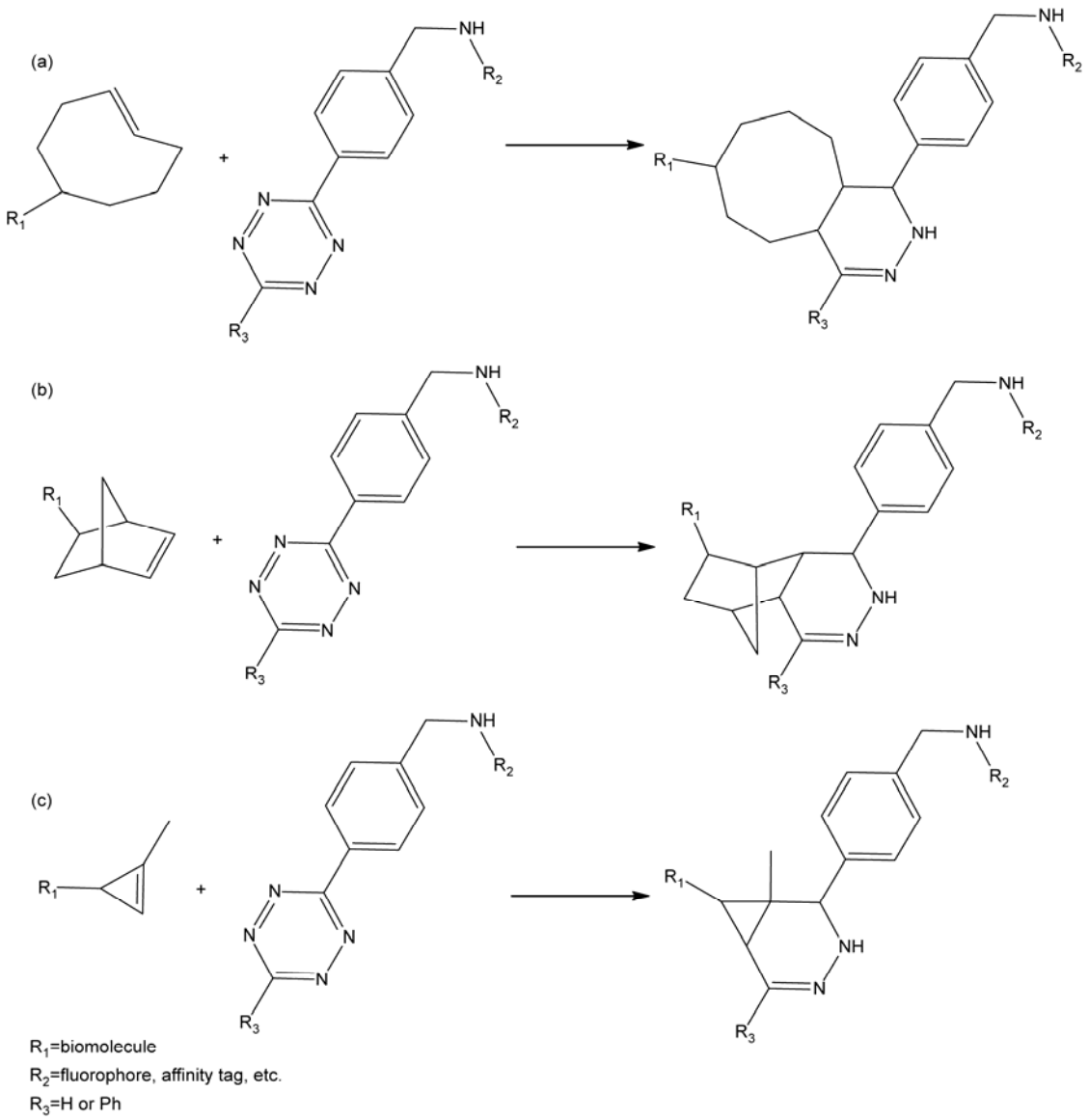

图 13　四嗪与双键间的狄尔斯-阿尔德反应

体内已经天然存在的各种反应基团互不干扰. 这类官能团常常需要生物体通过非天然的方式从体外获得, 并特异表达于生物大分子中. 因此, 在发展生物正交反应时, 如何有效而特异地将正交性官能团引入活体细胞, 并安装在生物大分子特定位点上, 是这一领域向前发展所面临的一个重要难题.

与此同时, 由斯坦福大学 Rao J 课题组[62]开发的末端半胱氨酸与氰基间的缩合反应也被成功用于化学生物学领域当中(图 14). 这一反应利用天然氨基酸进行, 而且反应温和、迅速, 因此具有很好的生物兼容性, 是一种理想的生物正交反应. 这一反应已经被成功用于对活细胞中的蛋白酶进行显影[63], 且也被成功用于对靶向性多肽 RGD 和荧光素酶蛋白分子进行放射性标记[64]. 虽然这一反应只需利用生物体内自带的半胱氨酸即可进行, 但其要求必须处于末端才能进行, 因此对于大部分化学生物学应用的要求仍然不能满足. 因此, 将带有可参与生物正交反应的化学活性官能团引入生物大分子的特定位点上, 仍是目前急需解决的难题.

目前生物学家正试图通过各种参与翻译后修饰的酶来对蛋白质进行修饰, 但这类酶特异性较差, 往往对体内的多种蛋白质产生作用, 其对底物的要求

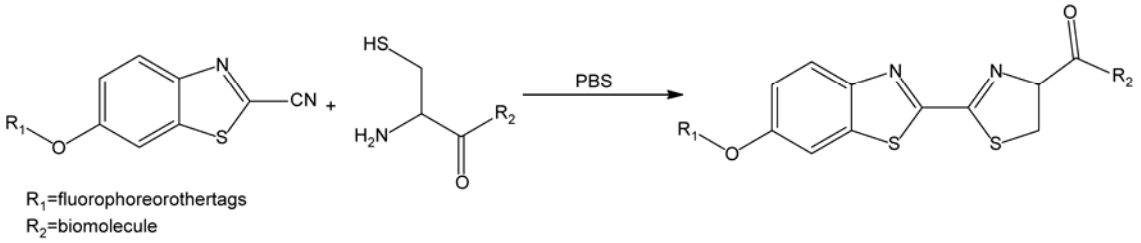

图 14 半胱氨酸与苯并噻唑的缩合反应

也相当苛刻. 而对蛋白质进行定点修饰则更需要多种蛋白质的协同作用, 是翻译后修饰酶自身无法完成的任务. 近年来, 化学家们通过不断的尝试, 成功地依靠化学的方法实现了蛋白质的从头合成. 而这其中又以 Kent 教授课题组[65]发展的活性化学连接法(native chemical ligation)最引人注目. 用这种方法合成的一些蛋白酶与天然蛋白酶的结构和性质完全相同, 并可根据不同需要加入特异的翻译后修饰, 受到了广泛的关注. 但这种方法仍然受到蛋白质尺度的限制, 大部分生物体内的重要蛋白质的尺度都超过了目前能够化学合成的上限. 虽然化学家们在不断研究新的合成方法, 尺度较大的蛋白质靠近 N 端和 C 端的部分也已经可以化学合成并成功连接, 但对于二、三维结构复杂, 含有多个蛋白质链或功能区域, 需要在生物体内完成各种空间折叠和组装的蛋白质来说, 化学从头合成的方法仍然难以逾越.

近年来, Scripps 研究所的 Peter Schultz 课题组[66,67]发展起来了一种以特异识别人工编码的系统来拓展天然遗传密码子的手段, 实现了多种非天然氨基酸在生物体内的“活体-遗传-定点”表达. 到目前为止, 这一革命性的技术已经将超过 50 种的非天然氨基酸成功地定点表达于活体细胞的蛋白质当中, 赋予了这些蛋白质各式新颖的物理、化学和生物性质. 这一方法在基础研究和生物技术应用等领域都产生了巨大的影响, 并展现了广阔的利用价值和前景. 美国加州理工学院 Tirrell 教授的研究小组通过生物代谢途径, 用含有化学活性官能团的非天然氨基酸来取代相应的天然氨基酸, 以实现这些官能团在蛋白质上的在体展示, 并用于包括神经细胞在内的多种细胞系内的新生蛋白质的成像与富集[68,69]. 与此同时, 在包括美国哈佛大学医学院的 Chris Walsh, 加州大学伯克利分校的 Carolyn Bertozzi, 麻省理工学院的 Alice Ting 等在内的多位著名科学家都致力于发展通过工程化的生物酶将化学官能团引入蛋白质上的方法[70], 其中的一些手段已经获得了广泛的应用.

各种生物正交反应的发展大大提高了科学家对生物体系操作的能力. 但是这些生物正交反应还存在许多有待完善的缺陷. 例如反应的生物正交性、反应速度、反应特异性、对反应物的浓度要求等. 生物正交反应的完成主要要求两步, 第一步是生物正交官能团的引入, 第二步是生物正交反应的发生. 科学界对生物正交反应的改进很多都是对第二步的改进, 例如增加环张力, HOMO 轨道能量的调节等. 光点击反应是生物正交反应中一类新颖的反应, 它不需要金属催化剂, 而且反应的发生可以被光调控, 大大拓宽了生物正交反应的应用范围, 是一类非常有前景的生物正交反应. 另一类的改进是对第一步的改进, 天然蛋白质中引入非天然氨基酸是这类改进中浓墨重彩的一笔. 各类生物正交反应都有其优势和劣势, 把不同的反应组合在一起应用可以达到相辅相成的效果. 未来, 除了荧光基团以外, 生物正交反应应该也有潜力将其他的成像技术例如核磁共振成像包含进来. 生物正交反应的发展及相应化学官能团向生物大分子的在体引入, 将显著地增强人们在活细胞体内实时、动态、可视化观察生物大分子的能力.

3 总结与展望

生物荧光团和生物正交反应的持续研究和不断进展已经为活细胞内的荧光标记和成像研究提供了较为丰富多样的选择, 但对理想的荧光探针的探寻则一直在继续, 发明亮度高、吸收和发射波长长且同时可用于活细胞水平检测和体内水平成像的理想荧光团仍具有较大的挑战性. 发展量子产率高的近红外小分子荧光团、毒性较低的纳米材料发色团以及结构优化的生物大分子荧光物质将是未来荧光团的主要发展趋势. 生物正交反应在近几年内得到了飞速的发展, 但因反应发生所需浓度较高或所用催化剂毒性较大, 进一步提高生物正交反应的生物兼容性、

现有生物正交反应的反应速率以及开发新型的可在水相中温和进行的生物正交反应将是其未来发展的主要趋势. 结合各种超分辨显微成像技术的发展与应用, 新的适合细胞内超分辨荧光成像的荧光团及其通过生物正交反应对细胞内特定位点的荧光成像也越来越成为本领域的热点前沿[71]. 在化学家、光物理学家和细胞生物学家的协同推动下, 我们完全有理由相信, 活细胞内的超分辨显微成像在不远的将来将大大增进人类对活性胞内发生的各种分子事件深入和崭新的理解. 同时, 荧光团及生物正交反应的发展将不仅为基础研究提供有力的工具, 而且也将极大地推动生命科学与医学的发展.

参考文献

1 Komatsu K, Urano Y, Kojima H, et al. Development of an iminocoumarin-based zinc sensor suitable for ratiometric fluorescence imaging of neuronal zinc. J Am Chem Soc, 2007, 129: 13447–13454

2 Du L, Ni N, Li M, et al. A fluorescent hydrogen peroxide probe based on a “click” modified coumarin fluorophore. Tetrahedron Lett, 2010, 51: 1152–1154

3 Xie Y, Dix A V, Tor Y. FRET enabled real time detection of RNA-small molecule binding. J Am Chem Soc, 2009, 131: 17605–17614

4 Li X, Ma H, Dong S, et al. Selective labeling of histidine by a designed fluorescein-based probe. Talanta, 2004, 62: 367–371

5 Sparano B A, Koide K. A strategy for the development of small-molecule-based sensors that strongly fluoresce when bound to a specific RNA. J Am Chem Soc, 2005, 127: 14954–14955

6 Newton I G, Plaisted W C, Messina-Graham S, et al. Optical imaging of progenitor cell homing to patient-derived tumors. Contrast Media Mol Imaging, 2012, 7: 525–536

7 LaMorte V J, Dyck J A, Ochs R L, et al. Localization of nascent RNA and CREB binding protein with the PML-containing nuclear body. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95: 4991–4996

8 Koide Y, Urano Y, Kenmoku S, et al. Design and synthesis of fluorescent probes for selective detection of highly reactive oxygen species in mitochondria of living cells. J Am Chem Soc, 2007, 129: 10324–10325

9 Koide Y, Urano Y, Hanaoka K, et al. Development of an Si-rhodamine-based far-red to near-infrared fluorescence probe selective for hypochlorous acid and its applications for biological imaging. J Am Chem Soc, 2011, 133: 5680–5682

10 Isik M, Ozdemir T, Turan I S, et al. Chromogenic and fluorogenic sensing of biological thiols in aqueous solutions using BODIPY-based reagents. Org Lett, 2013, 15: 216–219

11 Wang B, Li P, Yu F, et al. A reversible fluorescence probe based on Se-BODIPY for the redox cycle between HClO oxidative stress and H_2S repair in living cells. Chem Commun, 2013, 49: 1014–1016

12 Zhang S, Wu T, Fan J, et al. A BODIPY-based fluorescent dye for mitochondria in living cells, with low cytotoxicity and high photostability. Org Biomol Chem, 2013, 11: 555–558

13 Li J, Chen K, Liu H, et al. Activatable near-infrared fluorescent probe for *in vivo* imaging of fibroblast activation protein-alpha. Bioconjugate Chem, 2012, 23: 1704–1711

14 Zhu L, Zhang F, Ma Y, et al. *In vivo* optical imaging of membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP) activity. Mol Pharm, 2011, 8: 2331–2338

15 Pham W, Medarova Z, Moore A. Synthesis and application of a water-soluble near-infrared dye for cancer detection using optical imaging. Bioconjugate Chem, 2005, 16: 735–740

16 Wang L Q, Peng X J, Lu E H, et al. Novel heptamethine 3H-indocyanines and their spectral properties. Chin Chem Lett, 2005, 16: 461–464

17 Wang L Q, Zhao L, Nie W W, et al. Syntheses and properties of photostable near-infrared cyanines and their cyclodextrin conjugates. Chin Chem Lett, 2008, 19: 739–741

18 Cai W, Chen X. Preparation of peptide-conjugated quantum dots for tumor vasculature-targeted imaging. Nat Protoc, 2008, 3: 89–96

19 So M K, Xu C, Loening A M, et al. Self-illuminating quantum dot conjugates for *in vivo* imaging. Nat Biotechnol, 2006, 24: 339–343

20 So M K, Loening A M, Gambhir S S, et al. Creating self-illuminating quantum dot conjugates. Nat Protoc, 2006, 1: 1160–1164

21 Li J, Wu D, Miao Z, et al. Preparation of quantum dot bioconjugates and their applications in bio-imaging. Curr Pharm Biotechnol, 2010, 11: 662–671

22 Haase M, Schafer H. Upconverting nanoparticles. Angew Chem Int Ed, 2011, 50: 5808–5829

23 Nyk M, Kumar R, Ohulchanskyy T Y, et al. High contrast *in vitro* and *in vivo* photoluminescence bioimaging using near infrared to near infrared up-conversion in Tm^{3+} and Yb^{3+} doped fluoride nanophosphors. Nano Lett, 2008, 8: 3834–3838

24 Liu Q, Sun Y, Yang T, et al. Sub-10 nm hexagonal lanthanide-doped $NaLuF_4$ upconversion nanocrystals for sensitive bioimaging *in vivo*. J Am Chem Soc, 2011, 133: 17122–17125

25 Liu Q, Yang T, Feng W, et al. Blue-emissive upconversion nanoparticles for low-power-excited bioimaging *in vivo*. J Am Chem Soc, 2012, 134: 5390–5397

26 Cheng L, Yang K, Li Y, et al. Facile preparation of multifunctional upconversion nanoprobes for multimodal imaging and dual-targeted photothermal therapy. Angew Chem Int Ed, 2011, 50: 7385–7390

27 Remington S J. Green fluorescent protein: A perspective. Protein Sci, 2011, 20: 1509–1519

28 Tsien R Y. The green fluorescent protein. Annu Rev Biochem, 1998, 67: 509–544

29 Shaner N C, Steinbach P A, Tsien R Y. A guide to choosing fluorescent proteins. Nat Methods, 2005, 2: 905–909

30 Shcherbo D, Merzlyak E M, Chepurnykh T V, et al. Bright far-red fluorescent protein for whole-body imaging. Nat Methods, 2007, 4: 741–746

31 Hakkila K, Maksimow M, Karp M, et al. Reporter genes *lucFF*, *luxCDABE*, *gfp*, and *dsred* have different characteristics in whole-cell bacterial sensors. Anal Biochem, 2002, 301: 235–242

32 Choi W G, Swanson S J, Gilroy S. High-resolution imaging of Ca^{2+}, redox status, ROS and pH using GFP biosensors. Plant J, 2012, 70: 118–128

33 Chudakov D M, Matz M V, Lukyanov S, et al. Fluorescent proteins and their applications in imaging living cells and tissues. Physiol Rev, 2010, 90: 1103–1163

34 Baruch A, Jeffery D A, Bogyo M. Enzyme activity—it's all about image. Trends Cell Biol, 2004, 14: 29–35

35 Kerppola T K. Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis as a probe of protein interactions in living cells. Annu Rev Biophys, 2008, 37: 465–487

36 Tantama M, Hung Y P, Yellen G. Imaging intracellular pH in live cells with a genetically encoded red fluorescent protein sensor. J Am Chem Soc, 2011, 133: 10034–10037

37 Sankaranarayanan S, De Angelis D, Rothman J E, et al. The use of pH luorins for optical measurements of presynaptic activity. Biophys J, 2000, 79: 2199–2208

38 Sletten E M, Bertozzi C R. Bioorthogonal chemistry: Fishing for selectivity in a sea of functionality. Angew Chem Int Ed, 2009, 48: 6974–6998

39 李金波. 化学探针分子的构筑及化学生物学应用研究. 博士学位论文. 南京: 南京大学, 2012

40 Rostovtsev V V, Green L G, Fokin V V, et al. A stepwise huisgen cycloaddition process: Copper(I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes. Angew Chem Int Ed, 2002, 41: 2596–2599

41 Link A J, Tirrell D A. Cell surface labeling of *Escherichia coli* via copper(I)-catalyzed [3+2] cycloaddition. J Am Chem Soc, 2003, 125: 11164–11165

42 Deiters A, Cropp T A, Mukherji M, et al. Adding amino acids with novel reactivity to the genetic code of *Saccharomyces cerevisiae*. J Am Chem Soc, 2003, 125: 11782–11783

43 Speers A E, Adam G C, Cravatt B F. Activity-based protein profiling *in vivo* using a copper(I)-catalyzed azide-alkyne [3+2] cycloaddition. J Am Chem Soc, 2003, 125: 4686–4687

44 Besanceney-Webler C, Jiang H, Zheng T, et al. Increasing the efficacy of bioorthogonal click reactions for bioconjugation: A comparative study. Angew Chem Int Ed, 2011, 50: 8051–8056

45 Lin S, Zhang Z, Xu H, et al. Site-specific incorporation of photo-cross-linker and bioorthogonal amino acids into enteric bacterial pathogens. J Am Chem Soc, 2011, 133: 20581–20587

46 Yang M, Song Y, Zhang M, et al. Converting a solvatochromic fluorophore into a protein-based pH indicator for extreme acidity. Angew Chem Int Ed, 2012, 51: 7674–7679

47 Kodama K, Fukuzawa S, Nakayama H, et al. Site-specific functionalization of proteins by organopalladium reactions. Chem Bio Chem, 2007, 8: 232–238

48 Li N, Lim R K, Edwardraja S, et al. Copper-free Sonogashira cross-coupling for functionalization of alkyne-encoded proteins in aqueous medium and in bacterial cells. J Am Chem Soc, 2011, 133: 15316–15319

49 Brustad E, Bushey M L, Lee J W, et al. A genetically encoded boronate-containing amino acid. Angew Chem Int Ed, 2008, 47: 8220–8223

50 Chalker J M, Wood C S, Davis B G. A convenient catalyst for aqueous and protein Suzuki-Miyaura cross-coupling. J Am Chem Soc, 2009, 131: 16346–16347

51 Spicer C D, Triemer T, Davis B G. Palladium-mediated cell-surface labeling. J Am Chem Soc, 2012, 134: 800–803

52 Song W, Wang Y, Qu J, et al. A photoinducible 1,3-dipolar cycloaddition reaction for rapid, selective modification of tetrazole-containing proteins. Angew Chem Int Ed, 2008, 47: 2832–2835

53 Song W, Wang Y, Qu J, et al. Selective functionalization of a genetically encoded alkene-containing protein via "photoclick chemistry" in bacterial cells. J Am Chem Soc, 2008, 130: 9654–9655
54 Jewett J C, Bertozzi C R. Cu-free click cycloaddition reactions in chemical biology. Chem Soc Rev, 2010, 39: 1272–1279
55 Agard N J, Prescher J A, Bertozzi C R. A strain-promoted [3+2] azide-alkyne cycloaddition for covalent modification of biomolecules in living systems. J Am Chem Soc, 2004, 126: 15046–15047
56 Kohn M, Breinbauer R. The Staudinger ligation—a gift to chemical biology. Angew Chem Int Ed, 2004, 43: 3106–3116
57 Saxon E, Bertozzi C R. Cell surface engineering by a modified Staudinger reaction. Science, 2000, 287: 2007–2010
58 Blackman M L, Royzen M, Fox J M. Tetrazine ligation: Fast bioconjugation based on inverse-electron-demand Diels-Alder reactivity. J Am Chem Soc, 2008, 130: 13518–13519
59 Devaraj N K, Upadhyay R, Haun J B, et al. Fast and sensitive pretargeted labeling of cancer cells through a tetrazine/trans-cyclooctene cycloaddition. Angew Chem Int Ed, 2009, 48: 7013–7016
60 Devaraj N K, Weissleder R, Hilderbrand S A. Tetrazine-based cycloadditions: Application to pretargeted live cell imaging. Bioconjugate Chem, 2008, 19: 2297–2299
61 Patterson D M, Nazarova L A, Xie B, et al. Functionalized cyclopropenes as bioorthogonal chemical reporters. J Am Chem Soc, 2012, 134: 18638–18643
62 Liang G, Ren H, Rao J. A biocompatible condensation reaction for controlled assembly of nanostructures in living cells. Nat Chem, 2010, 2: 54–60
63 Ye D, Liang G, Ma M L, et al. Controlling intracellular macrocyclization for the imaging of protease activity. Angew Chem Int Ed, 2011, 50: 2275–2279
64 Jeon J, Shen B, Xiong L, et al. Efficient method for site-specific ^{18}F-labeling of biomolecules using the rapid condensation reaction between 2-cyanobenzothiazole and cysteine. Bioconjugate Chem, 2012, 23: 1902–1908
65 Dawson P E, Muir T W, Clark-Lewis I, et al. Synthesis of proteins by native chemical ligation. Science, 1994, 266: 776–779
66 Wang L, Schultz P G. Expanding the genetic code. Angew Chem Int Ed, 2004, 44: 34–66
67 Wang L, Xie J, Schultz P G. Expanding the genetic code. Annu Rev Biophys Biomol Struct, 2006, 35: 225–249
68 Link A J, Mock M L, Tirrell D A. Non-canonical amino acids in protein engineering. Curr Opin Biotechnol, 2003, 14: 603–609
69 Johnson J A, Lu Y Y, Van Deventer J A, et al. Residue-specific incorporation of non-canonical amino acids into proteins: Recent developments and applications. Curr Opin Chem Biol, 2010, 14: 774–780
70 Carrico I S, Carlson B L, Bertozzi C R. Introducing genetically encoded aldehydes into proteins. Nat Chem Biol, 2007, 3: 321–322
71 Lukinavičius1 G, Umezawa1 K, Olivier N, et al. A near-infrared fluorophore for live-cell superresolution microscopy of cellular proteins. Nat Chem, 2013, 5: 132–139

Recent progress on the development of probes for fluorescent imaging and bio-orthogonal reactions

ZHANG Yan[1], CHEN Peng R[2] & YAO ZhuJun[1]

[1] *School of Chemistry and Chemical Engineering, Nanjing University, Nanjing 210093, China;*
[2] *College of Chemistry and Molecular Engineering, Peking University, Beijing 100871, China*

Fluorescent imaging is a multidisciplinary integrated technology for bio-imaging. Application of fluorescent probes allows dynamic visualization of large bio-molecules inside cells and animals, which can benefit the diagnosis and treatment of various diseases. Satisfactory fluorophores and bio-orthogonal reactions play crucial roles in the construction of ideal fluorescent probes for *in vivo* imaging of cellular biopolymers and biological events. This review summarized the recent advance in these two areas with examples illustrating the applications in fluorescent bio-imaging.

fluorescent imaging, biopolymer, fluorophore, bio-orthogonal reaction, quantitative biology

doi: 10.1360/972013-232