



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 108069967 B

(45)授权公告日 2020.03.27

(21)申请号 201611003647.5

G01N 21/64(2006.01)

(22)申请日 2016.11.15

(56)对比文件

(65)同一申请的已公布的文献号

US 20140147876 A1,2014.05.29,

申请公布号 CN 108069967 A

Huarui He等.A fluorescent chemosensor for calcium with excellent storage stability in water.《analytica chimica acta》.2008,第611卷第197-204页.

(43)申请公布日 2018.05.25

(73)专利权人 中国科学院大连化学物理研究所

Jing Qi等.Fluorescent pH Sensors for Broad-Range pH Measurement Based on a Single Fluorophore.《Anal.Chem.》.2015,第87卷第5897-5904页.

地址 116023 辽宁省大连市沙河口区中山路457号

(72)发明人 徐兆超 苗露 赵秒 冷双

(74)专利代理机构 沈阳科苑专利商标代理有限公司 21002

审查员 王瑞

代理人 马驰

(51)Int.Cl.

G07D 473/18(2006.01)

G09K 11/06(2006.01)

权利要求书2页 说明书6页 附图5页

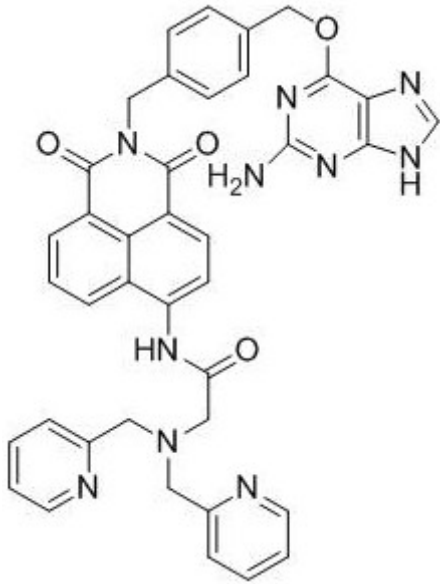
(54)发明名称

一种用于细胞内蛋白标记的荧光探针及其合成方法和应用

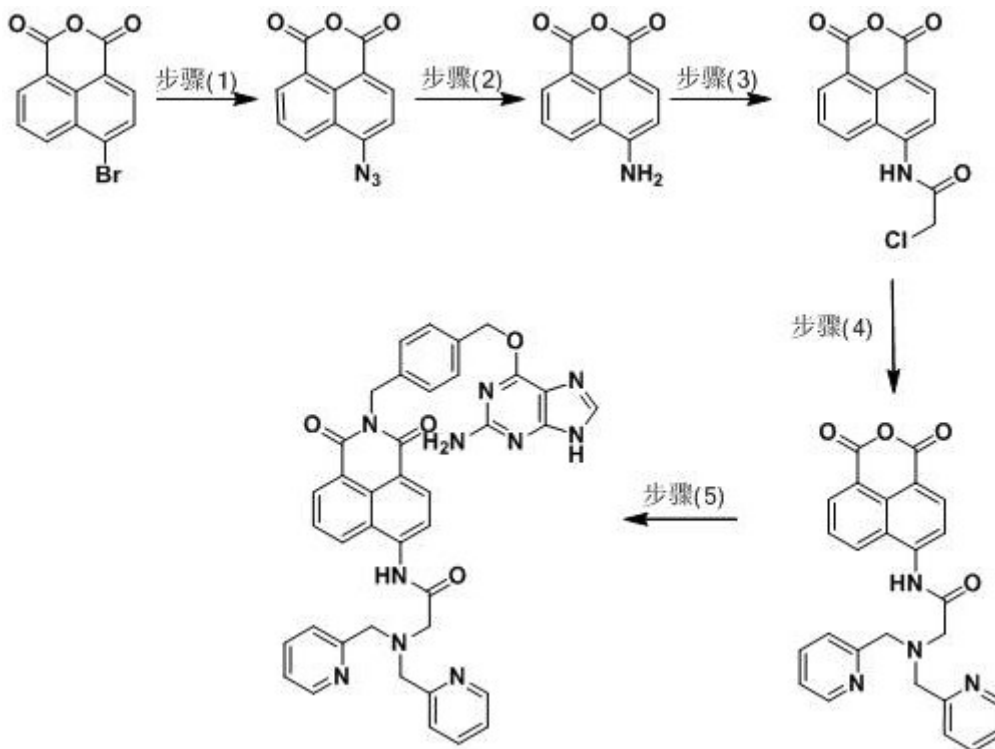
(57)摘要

本发明提供一种用于细胞内蛋白标记的荧光探针及其合成方法和应用,本发明提供的探针合成步骤简单,光稳定性好.与现有的用于细胞标记的荧光探针相比,该探针能够在复杂体系下专一性的与SNAP标签蛋白结合,标记细胞内的任一蛋白质.该探针还可以应用于细胞内铜离子的检测,随着铜离子浓度的增加,荧光逐渐消失从而达到检测铜离子的作用.本发明实现了在复杂环境中探针对任一蛋白质的标记与铜离子的检测作用,在生物及医学领域有极其重要的应用价值。

1. 一种用于细胞内蛋白标记的荧光探针,其特征在于:该荧光探针的结构如下:



2. 一种权利要求1所述细胞内蛋白标记的荧光探针的合成方法,其特征在于:合成路线为:



3. 根据权利要求2所述的合成方法,其特征在于:步骤如下:

(1) 中间体4-叠氮基-1,8-萘酐的合成:

4-溴-1,8-萘酐溶于N,N-二甲基甲酰胺(DMF)制成反应液,将叠氮化钠溶于水中,滴加至反应液,加热至90-100℃,反应4-8 h,冷却,倒入冰水中抽滤,得4-叠氮基-1,8-萘酐;

(2) 中间体4-氨基-1,8-萘酐的合成:

将4-叠氮基-1,8-萘酐置于乙腈中,并加入九水硫化钠,加热至50-70℃,持续8-20 h,冷却,倒入冰水中,抽滤得4-氨基-1,8-萘酐;

(3) 中间体4-(2-氯乙酰基)氨基-1,8-萘酐的合成:

将4-氨基-1,8-萘酐置于四氢呋喃中,并在冰浴下加入氯乙酰氯,室温搅拌10-16 h,减压除去溶剂,硅胶柱分离,减压除去溶剂得4-(2-氯乙酰基)氨基-1,8-萘酐;

(4) 中间体4-(2-(2,2-二甲基吡啶胺)乙酰基)氨基-1,8-萘酐的合成:

将4-(2-氯乙酰基)氨基-1,8-萘酐置于乙腈中,搅拌下加入2,2-二甲基吡啶胺,加热至50-70℃,反应2-4 h,减压除去溶剂,硅胶柱分离,减压除去溶剂得4-(2-(2,2-二甲基吡啶胺)乙酰基)氨基-1,8-萘酐;

(5) 终产物荧光探针的合成:

将4-(2-(2,2-二甲基吡啶胺)乙酰基)氨基-1,8-萘酐溶于乙醇中,搅拌下加入2-氨基-6-(4-氨基)苄氧基-嘌呤,加热至80-90℃,3-6 h,减压除去溶剂,硅胶柱分离,减压除去溶剂得荧光探针。

4. 如权利要求3所述的方法,其特征在于:步骤(3)中的硅胶柱分离以二氯甲烷为洗脱剂;

步骤(4)中的硅胶柱分离以二氯甲烷:甲醇=200:1-50:1为洗脱剂;

步骤(5)中的硅胶柱分离以二氯甲烷:甲醇=50:1-10:1为洗脱剂。

5. 如权利要求3所述的方法,其特征在于:步骤(1)中,4-溴-1,8-萘酐、N,N-二甲基甲酰胺DMF、叠氮化钠的质量比为2:(80-25):(1-2)。

6. 如权利要求3所述的方法,其特征在于:步骤(2)中,4-叠氨基-1,8-萘酐、乙腈、九水硫化钠的质量比为1:(40-80):(3-8)。

7. 如权利要求3所述的方法,其特征在于:步骤(3)中,4-氨基-1,8-萘酐、四氢呋喃、氯乙酰氯的质量比为(5-2.5):(60-80):1。

8. 如权利要求3所述的方法,其特征在于:步骤(4)中,4-(2-氯乙酰基)氨基-1,8-萘酐、乙腈、2,2-二甲基吡啶胺的质量比为(2-1.2):(60-100):1。

9. 如权利要求3所述的方法,其特征在于:步骤(5)中,4-(2-(2,2-二甲基吡啶胺)乙酰基)氨基-1,8-萘酐、乙醇、2-氨基-6-(4-氨基)苄氧基-嘌呤的质量比为1:(200-800):(1-1.5)。

10. 一种权利要求1所述荧光探针的应用,其特征在于:该荧光探针与SNAP标签蛋白专一性结合,用于非疾病诊断为目的的细胞内蛋白质的标记及对细胞内铜离子的检测。

## 一种用于细胞内蛋白标记的荧光探针及其合成方法和应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种用于细胞内蛋白标记的荧光探针及其合成方法和应用。

### 背景技术

[0002] 通过小分子荧光探针标记蛋白来研究活细胞中蛋白质的位置、功能、以及蛋白间的通讯,是目前一项先进的技术,被广泛研究。与荧光蛋白相比,蛋白标记技术显示出荧光探针优越的光物理特性、对标记的位置与时间的精准控制。尽管如此,为了达到更高的信号强度、提高信噪比,洗掉未反应的探针分子这一步骤却是必不可少的,从而限制了其对细胞的连续观测。

[0003] 通过标记蛋白标签来标记蛋白的荧光增强型荧光探针不但降低了背景信号,还大幅度提高了信噪比。尽管如此,目前报道的大部分荧光探针存在着一定的局限性。例如,细胞毒性较强的标记配体无法做到活细胞免洗标记;为了达到活细胞免洗蛋白标记,研究人员通常设计基于荧光能量共振转移(FRET)的荧光探针标记到不同的蛋白标签上。尽管如此,大部分探针在标记过程中只能适度的增强荧光,无法达到满意的效果。另外,以FRET为基础的荧光探针一般合成复杂,而较大的分子尺寸则降低了细胞渗透率导致较长的孵育时间。因此,具有高选择性、较快标记速度、较高的荧光开关功能和细胞渗透率的免洗型荧光探针仍然是研究人员探索的目标,作为活细胞内蛋白质的荧光标记被广泛的应用于蛋白质的研究及活细胞成像。

[0004] 本发明基于FPET效应设计合成了一个新颖的荧光探针,该探针能够在复杂的细胞环境内快速、专一的与SNAP标签蛋白共价连接从而标记目标蛋白。SNAP标签蛋白能够与O<sub>6</sub>修饰的苯甲基鸟嘌呤通过亲和反应而共价连接,并以其快速的反应速率、专一的结合能力、以及对细胞的几乎无毒性而被广泛应用于蛋白-蛋白间的通讯研究、药物释放、超高分辨和生物传感器等。本发明的目的是合成一个简单的PET型荧光探针,其能够快速专一的与SNAP标签蛋白结合产生荧光增强,而当铜离子存在时,该荧光会逐渐减弱从而实现铜离子的原位检测应用。

### 发明内容

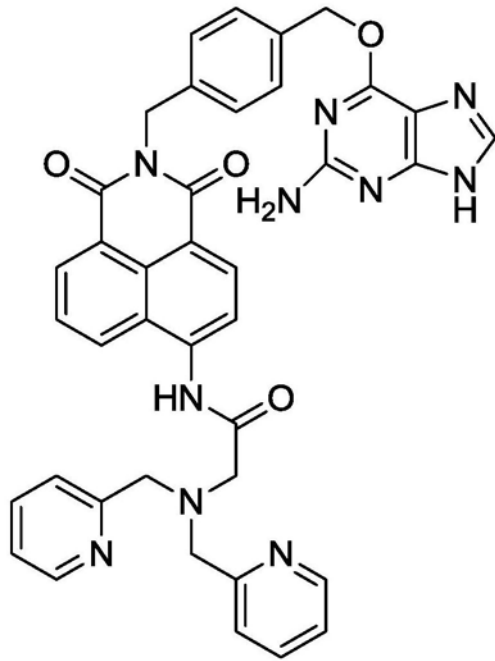
[0005] 本发明的目的之一是提供一种用于蛋白标记的荧光探针及应用,该探针能够与SNAP-tag蛋白特异性结合并呈现出~510nm处的荧光增强。同时还能原位检测铜离子。

[0006] 本发明的另一目的是提供所述蛋白标记的荧光探针的合成方法,该方法具有操作方便、原料廉价、提纯简单等优点。

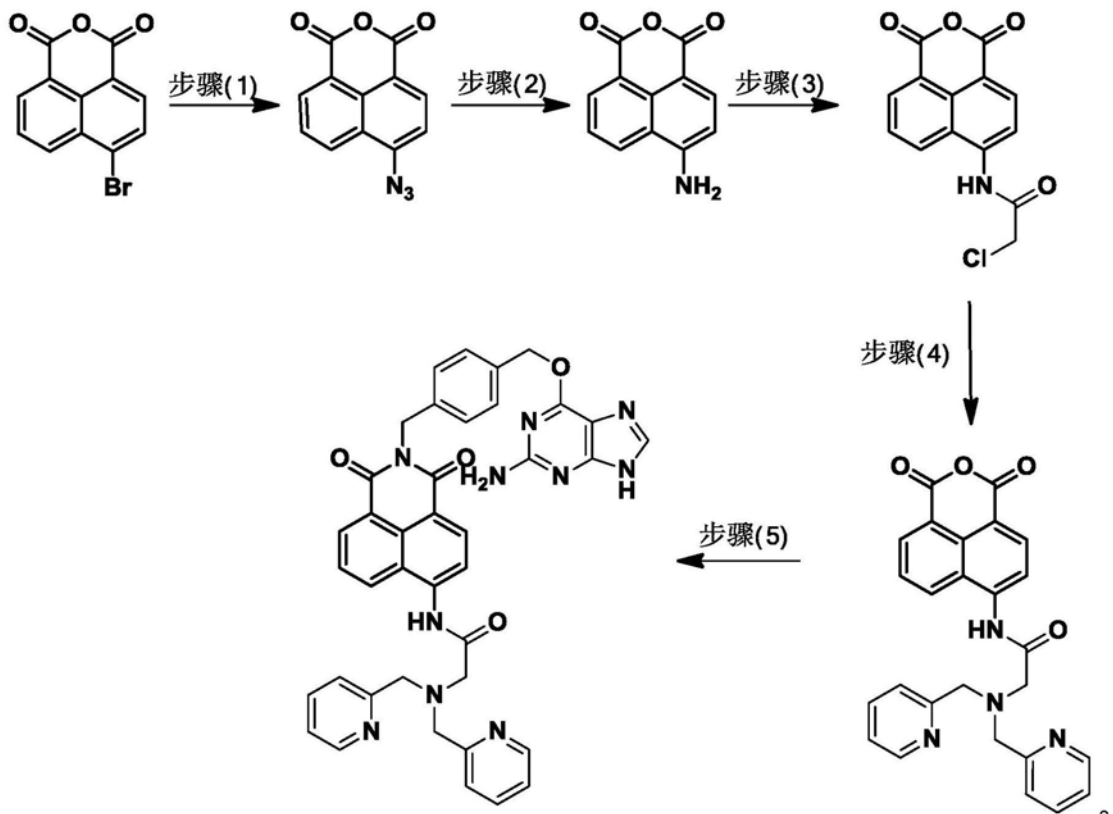
[0007] 本发明提供一种用于荧光标记的荧光探针,以4-(2-(二甲基吡啶胺)乙酰基)氨基-1,8-萘酰亚胺为荧光基团,苄氧基为结合位点,荧光探针能够特异性与SNAP蛋白结合并呈现~10倍荧光增强,其在~510nm处显示荧光信号。

[0008] 该荧光探针具有如下结构:

[0009]



[0010] 其合成路线,如下:



[0011]

[0012] 操作步骤如下:

[0013] (1) 中间体4-叠氮基-1,8-萘酐的合成:

[0014] 4-溴-1,8-萘酐溶于N,N-二甲基甲酰胺(DMF)制成反应液,将叠氮化钠溶于水中,滴加至反应液,加热至90-100℃,反应4-8h,冷却,倒入冰水中抽滤,得4-叠氮基-1,8-萘酐;

[0015] (2) 中间体4-氨基-1,8-萘酐的合成:

[0016] 将4-叠氮基-1,8-萘酐置于乙腈中,并加入九水硫化钠,加热至50-70℃,持续8-

20h,冷却,倒入冰水中,抽滤得4-氨基-1,8-萘酚;

[0017] (3) 中间体4-(2-氯乙酰基)氨基-1,8-萘酚的合成:

[0018] 将4-氨基-1,8-萘酚置于四氢呋喃中,并在冰浴下加入氯乙酰氯,室温搅拌10-16h,减压除去溶剂,硅胶柱分离,减压除去溶剂得4-(2-氯乙酰基)氨基-1,8-萘酚;

[0019] (4) 中间体4-(2-(2,2-二甲基吡啶胺)乙酰基)氨基-1,8-萘酚的合成:

[0020] 将4-(2-氯乙酰基)氨基-1,8-萘酚置于乙腈中,搅拌下加入2,2-二甲基吡啶胺,加热至50-70℃,反应2-4h,减压除去溶剂,硅胶柱分离,减压除去溶剂得4-(2-(2,2-二甲基吡啶胺)乙酰基)氨基-1,8-萘酚;

[0021] (5) 终产物荧光探针的合成:

[0022] 将4-(2-(2,2-二甲基吡啶胺)乙酰基)氨基-1,8-萘酚溶于乙醇中,搅拌下加入2-氨基-6-(4-氨基)苄氧基-嘌呤,加热至80-90℃,3-6h,减压除去溶剂,硅胶柱分离,减压除去溶剂得荧光探针。

[0023] 步骤(3)中的硅胶柱分离以二氯甲烷为洗脱剂;

[0024] 步骤(4)中的硅胶柱分离以二氯甲烷:甲醇=200:1-50:1(优选为80:1-20:1)为洗脱剂;

[0025] 步骤(5)中的硅胶柱分离以二氯甲烷:甲醇=50:1-10:1(优选为40:1-10:1)为洗脱剂。

[0026] 步骤(1)中,4-溴-1,8-萘酚、N,N-二甲基甲酰胺(DMF)、叠氮化钠的质量比为2:(80-25):(1-2)。

[0027] 步骤(2)中,4-叠氮基-1,8-萘酚、乙腈、九水硫化钠的质量比为1:(40-80):(3-8)。

[0028] 步骤(3)中,4-氨基-1,8-萘酚、四氢呋喃、氯乙酰氯的质量比为(5-2.5):(60-80):1。

[0029] 步骤(4)中,4-(2-氯乙酰基)氨基-1,8-萘酚、乙腈、2,2-二甲基吡啶胺的质量比为(2-1.2):(60-100):1。

[0030] 步骤(5)中,4-(2-(2,2-二甲基吡啶胺)乙酰基)氨基-1,8-萘酚、乙醇、2-氨基-6-(4-氨基)苄氧基-嘌呤的质量比为1:(200-800):(1-1.5)。

[0031] 本发明还提供该荧光探针于对细胞内蛋白质的标记及铜离子的原位检测中的应用。

[0032] 本发明的有益效果为:

[0033] 本发明提供的探针合成原料低价,步骤简单,易纯化,光稳定性好。

[0034] 该小分子荧光探针在PET的淬灭作用下荧光微弱,而在体外检测过程中,其作为底物能与SNAP标签蛋白在温和的条件下共价结合,结合后因嘌呤基团反应掉,PET作用消失而产生荧光,荧光增强约10倍,最大发射波长约为510nm。

[0035] 该类探针在水溶液中荧光微弱,与SNAP-tag蛋白特异性结合之后,~510nm处产生荧光,荧光增强约10倍。这种荧光增强可以排除其他因素的干扰,达到更精准的定位SNAP-tag蛋白。

[0036] 该探针可以应用于细胞内铜离子的检测,随着铜离子浓度的增加,荧光逐渐消失从而达到检测铜离子的作用。

[0037] 与现有的用于细胞标记的荧光探针相比,该探针能够在复杂体系下专一性的与

SNAP标签蛋白结合,引入到目标蛋白中,标记细胞内的任一蛋白质,对目标蛋白进行精准的监测。

[0038] 本发明实现了在复杂环境中探针对任一个蛋白质的标记与铜离子的检测作用,在生物及医学领域有极其重要的应用价值。

### 附图说明

[0039] 图1本发明荧光探针的结构式;

[0040] 图2本发明荧光探针合成路线图;

[0041] 图3实施例1制备的荧光探针核磁谱图氢谱;

[0042] 图4实施例1制备的荧光探针核磁谱图碳谱;

[0043] 图5实施例1制备的探针与SNAP蛋白反应前后的MALDI-TOF质谱图;

[0044] 图6实施例1制备的探针与SNAP蛋白反应前后的荧光光谱图,探针浓度为1 $\mu$ M,蛋白浓度为2 $\mu$ M。

[0045] 图7为实施例1制备的探针与SNAP蛋白反应后与各种金属离子的作用情况。

[0046] 图8中实施例1制备的探针与SNAP蛋白反应后,铜离子的滴定光谱图。

[0047] 图9为实施例1制备的探针加入转染了pSNAP-cox8A (NEB) 质粒的HEK293细胞中并且加入铜离子后的荧光共聚焦显微镜图像。

### 具体实施方式

[0048] 实施例1:用于蛋白标记的新型荧光探针的合成方法。

[0049] 中间体4-叠氮基-1,8-萘酐的合成:

[0050] 将4-溴-1,8-萘酐(2.5g,9mmol)置于100mL单口瓶中,加入20mL N,N-二甲基甲酰胺。将叠氮化钠(1.8g,27.7mmol)溶于3.5mL水中并滴加至反应液,加热至100 $^{\circ}$ C,持续6h,冷却,倒入冰水中抽滤,真空干燥得深黄色固体2g,产率92%。

[0051] 中间体4-氨基-1,8-萘酐的合成:

[0052] 将4-叠氮基-1,8-萘酐(1.8g,7.6mmol)溶于100mL乙腈中,并加入九水硫化钠(6.5g,41mmol)。加热至60 $^{\circ}$ C,持续10h,冷却,倒入冰水中,抽滤,真空干燥得到黄色固体1.3g,产率80%。

[0053] 中间体4-(2-氯乙酰基)氨基-1,8-萘酐的合成:

[0054] 将4-氨基-1,8-萘酐(1.0g,4.7mmol)置于60mL四氢呋喃中,并在冰浴下加入0.5mL氯乙酰氯。室温搅拌过夜,减压除去溶剂,硅胶柱分离,以二氯甲烷为洗脱剂,减压除去溶剂得米白色固体1.0g,产率76%。

[0055] 中间体4-(2-(2,2-二甲基吡啶胺)乙酰基)氨基-1,8-萘酐的合成:

[0056] 将4-(2-氯乙酰基)氨基-1,8-萘酐(500mg,1.7mmol),KI(830mg,5mmol),850 $\mu$ L DIPEA置于50mL乙腈中,搅拌下加入2,2-二甲基吡啶胺(250mg,1.25mmol)。将反应液加热至60 $^{\circ}$ C,持续2h,减压除去溶剂,硅胶柱分离,以二氯甲烷:甲醇=20:1为洗脱剂,减压除去溶剂得淡黄色固体280mg,产率50%。

[0057] 目标探针的合成:

[0058] 将4-(2-(2,2-二甲基吡啶胺)乙酰基)氨基-1,8-萘酐(50mg,0.11mmol)溶于20mL

乙醇中,搅拌下加入2-氨基-6-(4-氨基)苄氧基-嘌呤(32mg,0.12mmol)。加热至85℃,持续6h,减压除去溶剂,得淡黄色固体54mg,产率70%。<sup>1</sup>H NMR(400MHz,DMSO) δ11.51(s,1H),8.98(d,J=8.5Hz,1H),8.60(d,J=7.2Hz,1H),8.49(s,1H),8.41(d,J=4.5Hz,1H),8.03-7.97(m,1H),7.94(d,J=7.8Hz,1H),7.85(s,1H),7.78-7.71(m,1H),7.45(d,J=8.2Hz,1H),7.39(d,J=8.2Hz,1H),7.30-7.20(m,1H),5.44(s,1H),5.27(s,1H),4.06(s,1H),3.65(s,1H)。<sup>13</sup>C NMR(101MHz,DMSO) δ171.06,164.05,163.43,160.07,158.49,149.61,140.42,137.76,137.27,132.77,131.68,129.05,128.97,128.12,127.14,123.90,123.54,123.05,122.75,117.33,117.25,66.99,60.44,58.97,43.24。

[0059] 将该探针溶于DMSO溶液中,配制成2mM母液,根据需要配成不同浓度测试溶液,检测其荧光光谱变化。

[0060] 实施例2:探针与SNAP蛋白反应前后的MALDI-TOF质谱

[0061] 在含5μM SNAP蛋白的1mL,20mM,pH=7.4的PBS溶液中加入7.5μL探针溶液(母液为2mM的DMSO溶液),37℃下搅拌,2h后用8000Da的透析袋在20mM,pH=7.4的PBS溶液中透析去除多余的探针,取10μL反应液与10μLSNAP蛋白分别打MALDI-TOF-MS。

[0062] 图5中显示SNAP蛋白的分子量为21634.03,与荧光探针反应后MALDI-TOF-MS中呈现一个单峰,证明SNAP蛋白反应完全,分子量为22187.52,与理论上SNAP蛋白与探针的反应产物分子量相同,证明SNAP蛋白与探针共价反应。

[0063] 实施例3:探针与SNAP蛋白反应前后的荧光光谱图

[0064] 在5μM,2mL SNAP蛋白PBS溶液中加入1μL探针母液,37℃下反应1h后检测其荧光光谱,以未反应的1μM探针的荧光光谱为对照。

[0065] 图6中荧光探针浓度均为1μM,探针与SNAP蛋白反应后在~510nm荧光强度明显增强,约10倍。

[0066] 实施例4:探针与SNAP蛋白反应后与各个金属离子的作用

[0067] 在5μM,10mL SNAP蛋白PBS溶液中加入12.5μL探针母液,37℃下反应1h后加入15mL PBS溶液将探针稀释至1μM。每次取1mL稀释后的探针-SNAP反应液分别加入0.5μL Zn<sup>2+</sup>,Ca<sup>2+</sup>,Cr<sup>2+</sup>,K<sup>+</sup>,Mg<sup>2+</sup>,Na<sup>+</sup>,Pd<sup>2+</sup>,Mn<sup>2+</sup>,Pt<sup>2+</sup>,Fe<sup>2+</sup>,Fe<sup>3+</sup>,Ni<sup>2+</sup>,Pb<sup>2+</sup>,Cd<sup>2+</sup>,Ag<sup>+</sup>,Co<sup>2+</sup>,Hg<sup>2+</sup>,Cu<sup>+</sup>,Cu<sup>2+</sup>,以及所有的金属离子母液(金属离子母液均为10mM的水溶液)。20min后检测其荧光强度。以F/F<sub>0</sub>为纵坐标作图,其中F为与金属离子反应后的荧光强度,F<sub>0</sub>为与金属离子反应前的荧光强度。

[0068] 图7中荧光探针浓度为1μM,金属离子浓度均为5μM。加入铜离子后荧光减弱约10倍,证明了铜离子的淬灭作用。

[0069] 实施例5:Cu<sup>+</sup>滴定实验

[0070] 在20μM,2mL SNAP蛋白PBS溶液中加入10μL探针母液,37℃下反应1h后逐滴加入Cu<sup>+</sup>母液使Cu<sup>+</sup>浓度达到2μM,4μM,6μM,8μM,10μM,14μM,18μM,22μM,26μM,30μM并进行荧光光谱测试。

[0071] 图8中10μM探针与SNAP蛋白结合后荧光强度约为900,随着Cu<sup>+</sup>的加入荧光强度逐渐减弱。证明对Cu<sup>+</sup>的检测作用。

[0072] 实施例6:细胞实验

[0073] 将HEK293细胞(人肾上皮细胞系)铺在培养皿中,皿中含有10%胎牛血清的1640培



培养基,在37℃和5%二氧化碳条件下培养48小时,用PBS缓冲液轻柔洗涤细胞2次后更换新鲜不含有血清的培养液。然后向其逐滴加入转染工作液(含pSNAP-cox8质粒,NEB),然后置于37℃,5%CO<sub>2</sub>培养箱中进行培养。4小时后,弃去转染工作液,更换为含有血清的新鲜培养基,转染24小时后向其中加入5μM的探针,孵育20分钟后,直接用共聚焦显微镜在405nm激发得到图9(c),证明了探针的免洗标记,随后加入MitoTracker Deep Red商业染料共同孵育10分钟,用PBS缓冲液洗涤细胞2次后用共聚焦显微镜在640nm激发得到图9(b),证明了转染的SNAP蛋白在细胞内的线粒体上表达且探针可通过蛋白标签法标记细胞内的线粒体。之后弃掉培养基,用PBS缓冲液洗涤细胞3次,加入1mL PBS缓冲液,再加入50μM的Cu<sup>+</sup>孵育20分钟。共聚焦显微镜在405nm激发得到图9(d),证明了Cu<sup>+</sup>的淬灭作用,进而对细胞内Cu<sup>+</sup>进行检测,图9(a)为细胞的共聚焦亮场图。

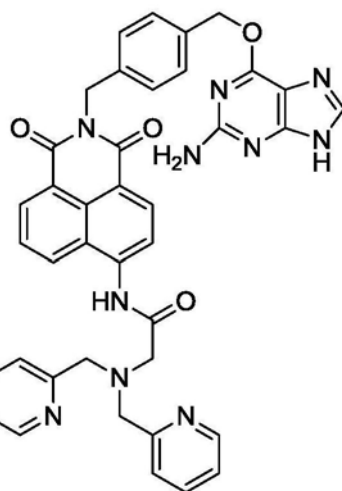


图1

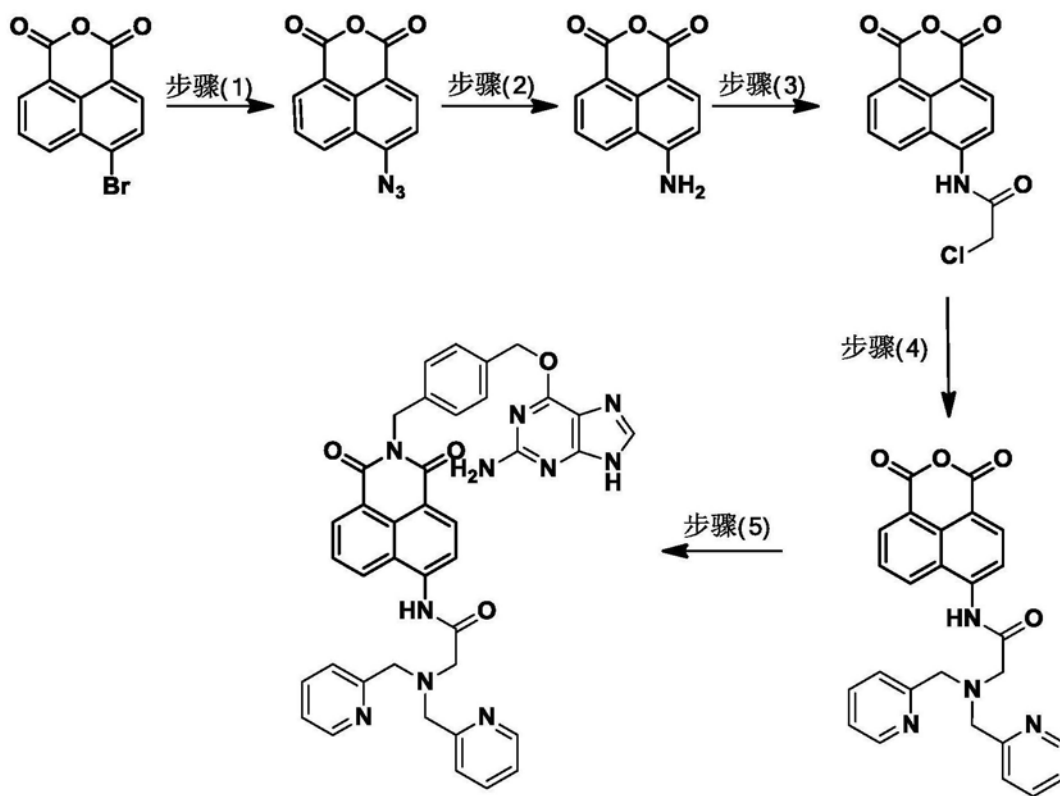


图2

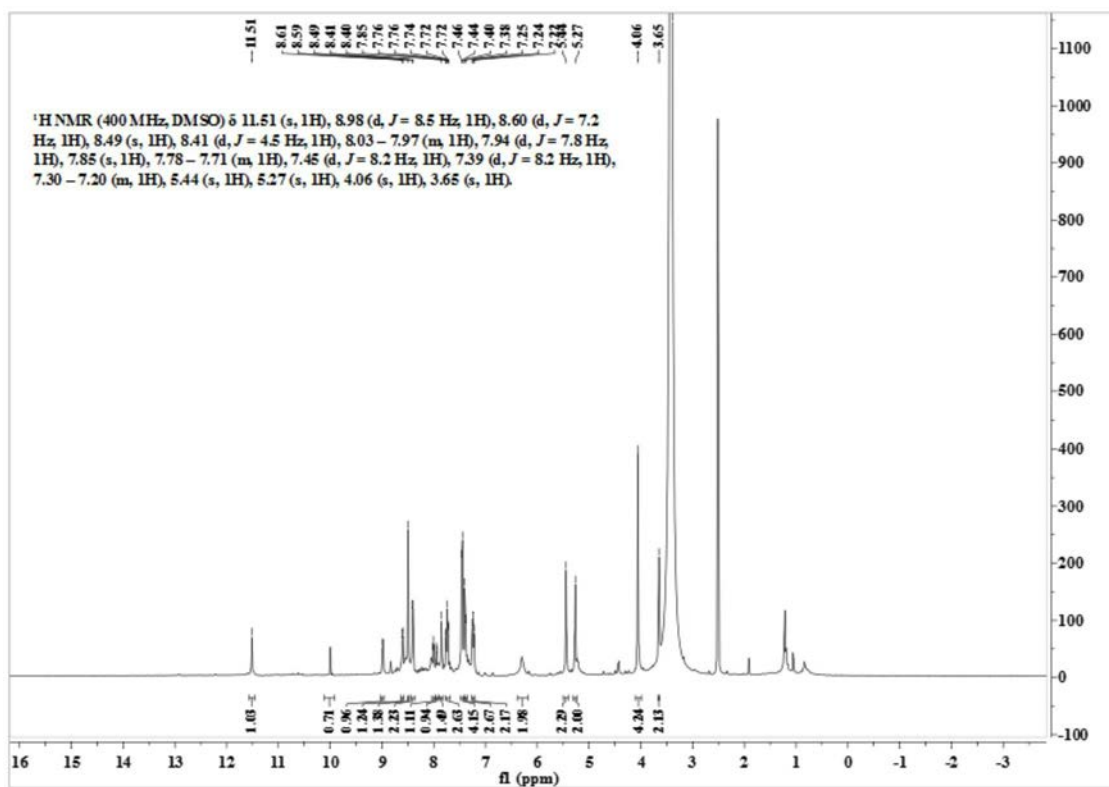


图3

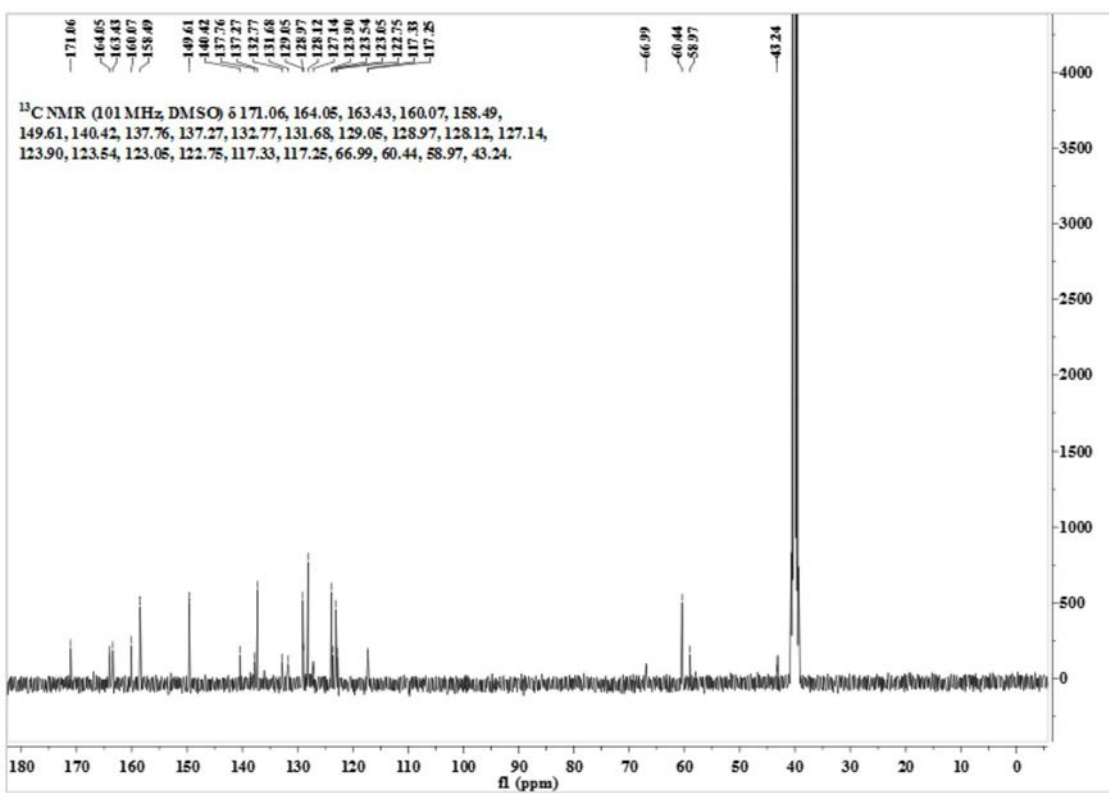


图4

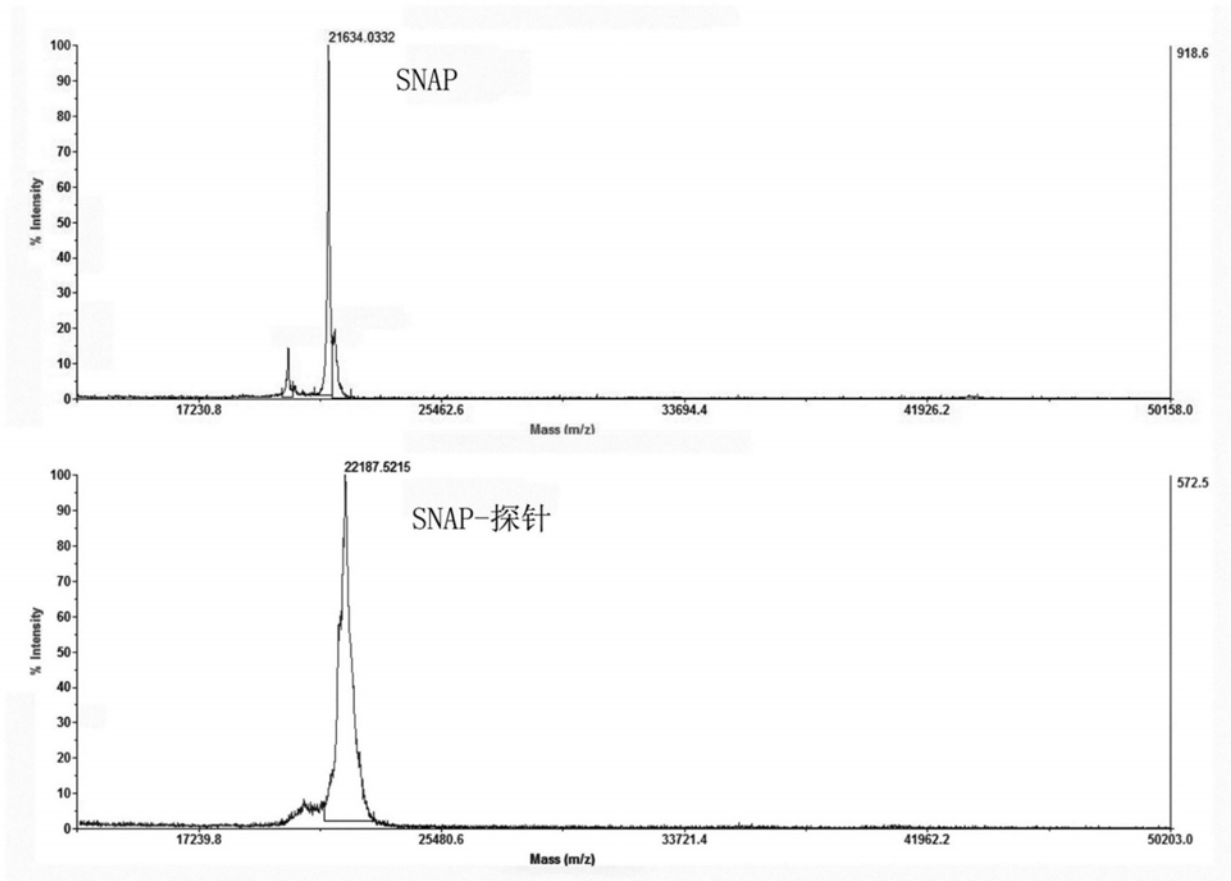


图5

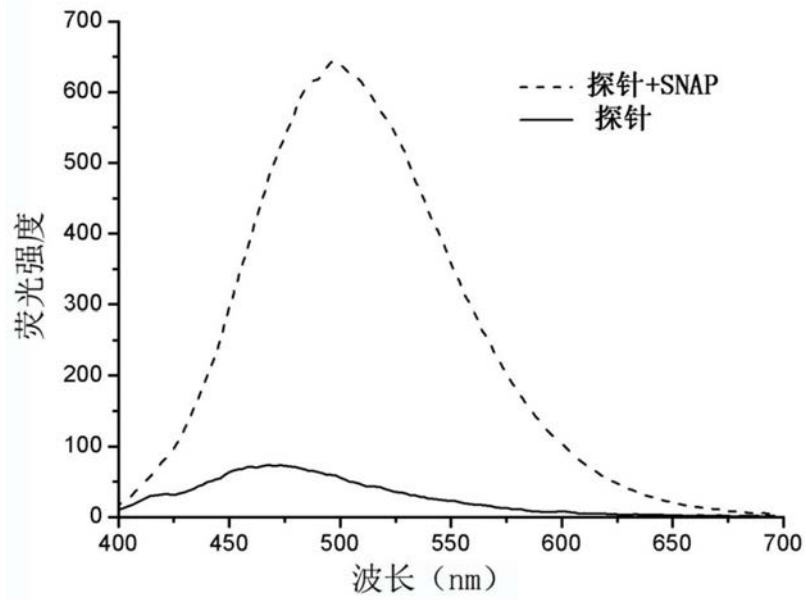


图6

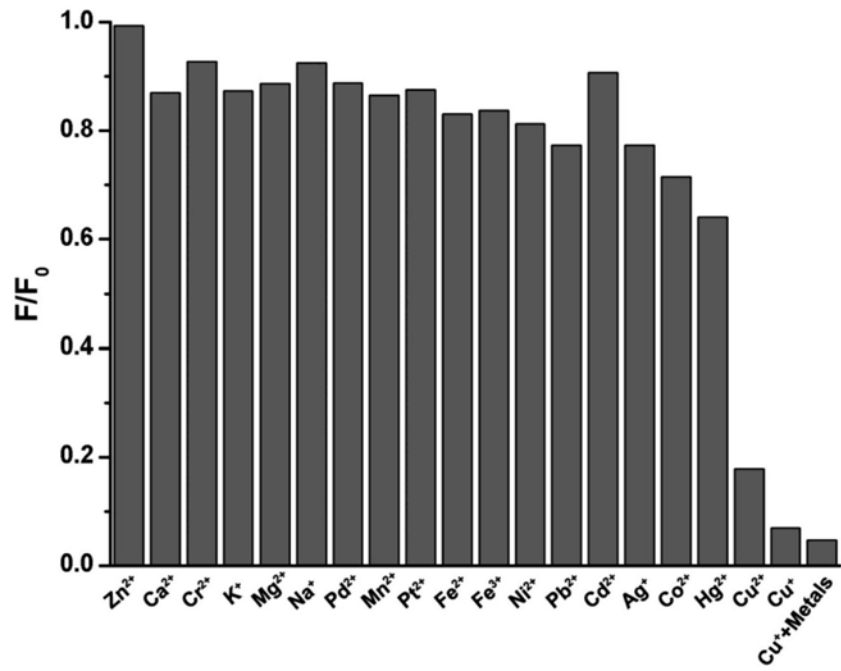


图7

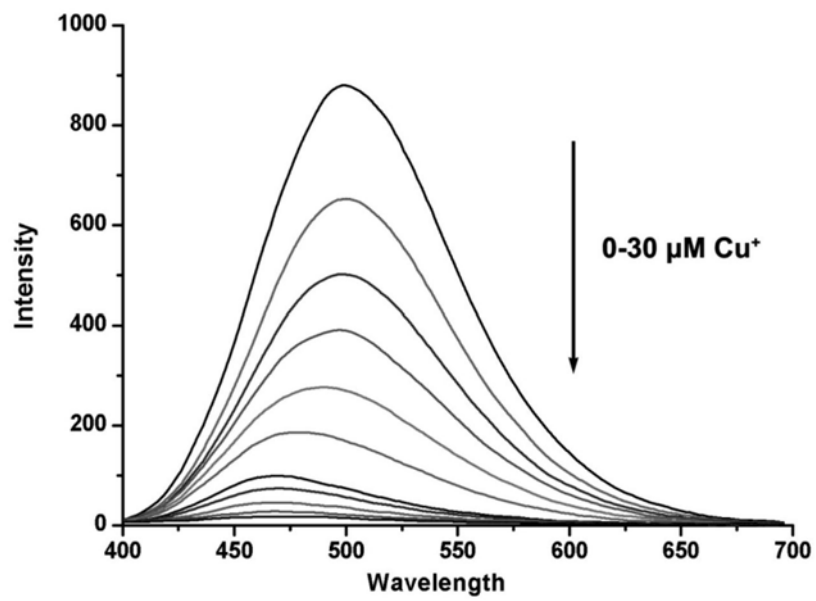


图8

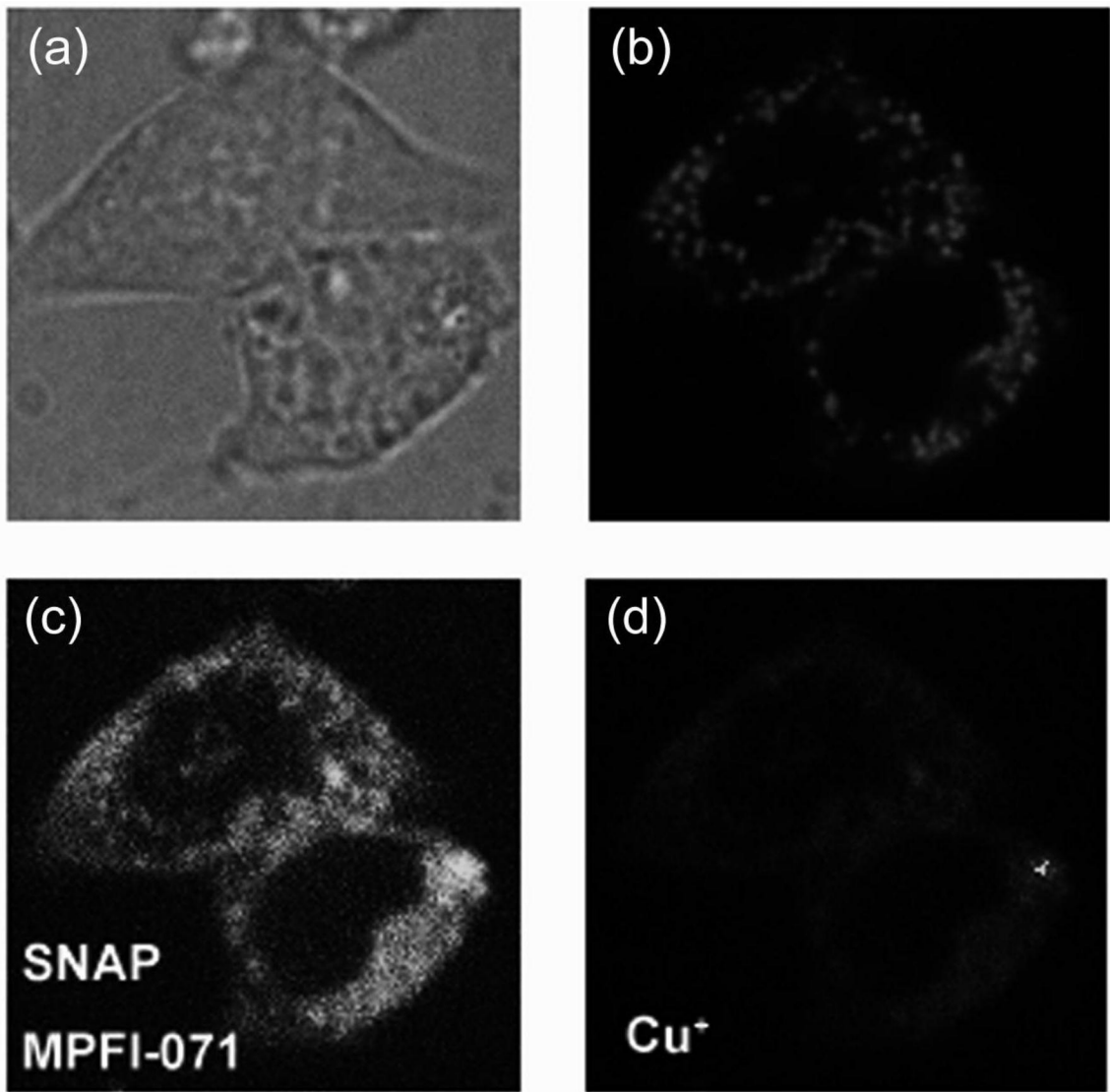


图9