



(21) 申请号 202110721493.8

(22) 申请日 2021.06.28

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 113354676 A

(43) 申请公布日 2021.09.07

(73) 专利权人 香港理工大学深圳研究院
地址 518057 广东省深圳市南山区粤海街
道高新技术产业园南区粤兴一道18号
香港理工大学产学研大楼205室

(72) 发明人 黄文健 柯桦怡 邓杰仁 柯子斌
陈颖祥

(74) 专利代理机构 深圳市君胜知识产权代理事
务所(普通合伙) 44268
专利代理师 刘芙蓉

(51) Int.Cl.

G07F 7/08 (2006.01)

G09K 11/06 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 106995451 A, 2017.08.01

CN 107964257 A, 2018.04.27

CN 108690011 A, 2018.10.23

CN 109336915 A, 2019.02.15

CN 109553596 A, 2019.04.02

CN 109897625 A, 2019.06.18

审查员 李鹏云

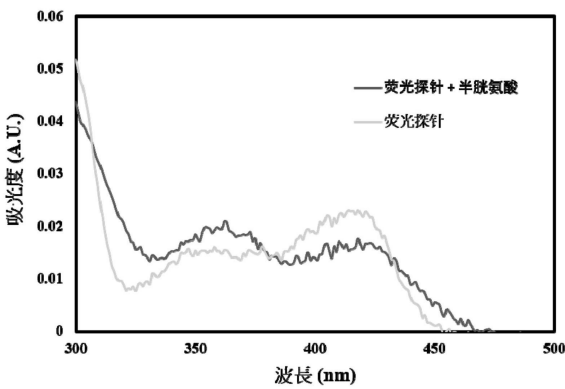
权利要求书2页 说明书12页 附图6页

(54) 发明名称

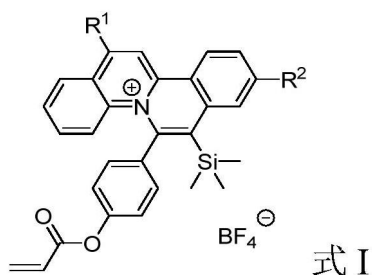
一种半胱氨酸荧光探针及其制备方法与应
用

(57) 摘要

本发明公开一种半胱氨酸荧光探针及其制
备方法与应用,其中半胱氨酸荧光探针包括喹啉
鎓离子为骨架,通过碳硅单键与所述喹啉鎓离子
骨架结构键合的三甲基硅基、以及通过碳碳单键
与所述喹啉鎓离子骨架结构相连的丙烯酸对苯
酯基团以及抗衡离子。该半胱氨酸荧光探针的荧
光强度在加入半胱氨酸时几乎完全淬灭,其荧光
强度与半胱氨酸浓度以线性关系相应下降,对半
胱氨酸有高选择性,可以从三种生物硫醇中区分
出半胱氨酸,适合广泛应用于活细胞中半胱氨酸
的检测。

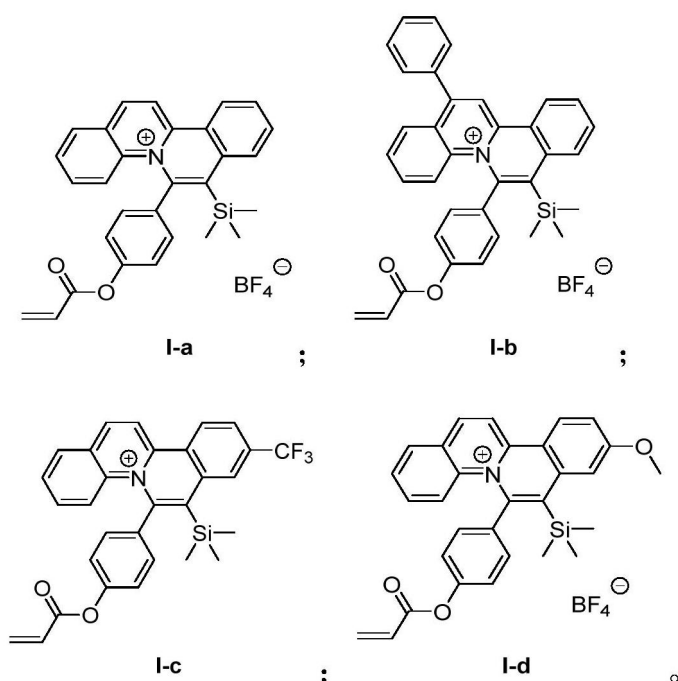


1. 一种半胱氨酸荧光探针, 其特征在于, 所述半胱氨酸荧光探针的结构通式如式I所示:



其中, R^1 选自氢或苯基, R^2 选自氢、三氟甲基或甲氧基。

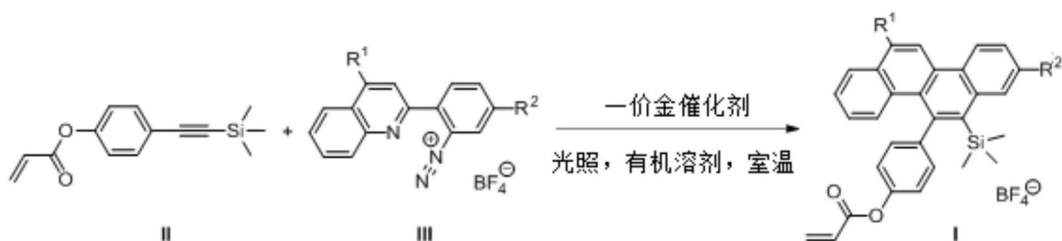
2. 根据权利要求1所述的半胱氨酸荧光探针, 其特征在于, 所述半胱氨酸荧光探针选自如下结构式中的一种:



3. 一种权利要求1-2任一项所述的半胱氨酸荧光探针的制备方法, 其特征在于, 包括步骤:

将化合物II、化合物III和一价金催化剂溶于有机溶剂中, 在光照射和16℃-25℃室温条件下进行反应, 得到目标化合物I, 即所述半胱氨酸荧光探针;

上述反应路线如下所示:



其中, R^1 选自氢或苯基, R^2 选自氢、三氟甲基或甲氧基。

4. 根据权利要求3所述的半胱氨酸荧光探针的制备方法, 其特征在于, 所述化合物II、

化合物III和—价金催化剂的摩尔比为(1.0~1.5):(1.5~2.0):(0.05~0.1)。

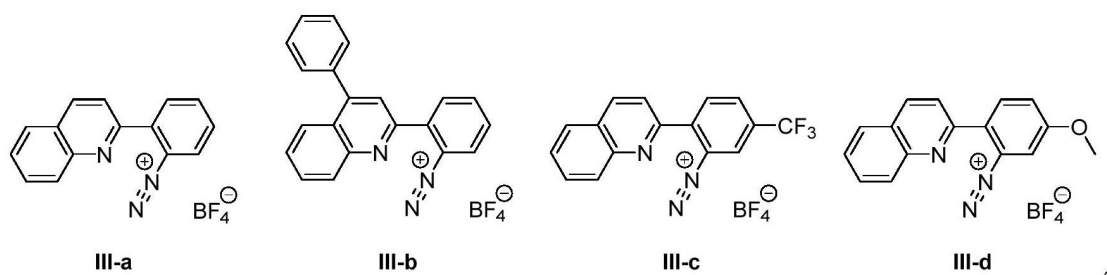
5. 根据权利要求3所述的半胱氨酸荧光探针的制备方法,其特征在于,所述反应的时间为16~18小时。

6. 根据权利要求3所述的半胱氨酸荧光探针的制备方法,其特征在于,所述光照射为 ≥ 3 瓦的蓝色LED灯照射。

7. 根据权利要求3所述的半胱氨酸荧光探针的制备方法,其特征在于,所述—价金催化剂为三(4-三氟甲基苯基)氯化金或三苯基膦氯化金。

8. 根据权利要求3所述的半胱氨酸荧光探针的制备方法,其特征在于,所述有机溶剂为乙腈,或所述有机溶剂选自甲醇、乙醇、丙醇、丁醇、甲苯、氯仿中的至少一种与乙腈组成的混合溶液。

9. 根据权利要求3所述的半胱氨酸荧光探针的制备方法,其特征在于,所述化合物III可以选自如下结构式中的一种:



10. 权利要求1~2任一所述的半胱氨酸荧光探针或者由权利要求3~9任一项所述的制备方法制备的半胱氨酸荧光探针在非疾病诊断和/或治疗为目的的半胱氨酸的荧光检测中的应用。

一种半胱氨酸荧光探针及其制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明涉及有机小分子荧光探针技术领域,尤其涉及一种半胱氨酸荧光探针及其制备方法与应用。

背景技术

[0002] 低分子量生物硫醇,包括半胱氨酸(Cys)、高半胱氨酸(Hcy)和谷胱甘肽(GSH),是重要的生物分子,对许多生物过程都有重要贡献。生物硫醇具有强大的氧化还原特性和亲核性,可作为抗氧化剂,保护细胞和组织免受内源性活性氧(ROS)和自由基的氧化。除此之外,生物系统中的生物硫醇还参与不同的生物过程,例如:信号传导,细胞生长和凋亡,蛋白质生物合成和免疫系统调节等。在细胞和生物体液中,各种生物硫醇的浓度各不相同,而在生物系统的代谢作用和运输作用中,生物硫醇的不平衡生成与一系列的身体状况有关。

[0003] 在三种生物硫醇中,半胱氨酸是唯一参与蛋白质和肽的构建、酶活性位点和辅因子的氨基酸。半胱氨酸也是调节生物氮平衡和氧化还原稳态的重要生物分子,其浓度能作为几种疾病的生物标志:缺乏半胱氨酸会导致儿童发育迟缓、脱发、肝功能损害、水肿、皮肤病变等;过高水平的半胱氨酸能引起心血管和神经毒性疾病。所以,精确且快速地检测人体细胞内外的半胱氨酸浓度对研究人体的生理病理过程和疾病的诊断都具有重要意义。

[0004] 传统的半胱氨酸检测技术包括高效液相色谱法(HPLC)、毛细管区带电泳法(CZE)和质谱法(MS)。然而,这些技术需要专用的设备、繁复的样品制备和熟练的专业人员,因此成本较高。相比之下,荧光探针比其他类型的检测方法具有先天优势,包括操作简单、高选择性、高灵敏度、可实时检测、成本低,且大多数情况下对细胞无害。可是,由于半胱氨酸、高半胱氨酸和谷胱甘肽的结构相似性,难以同时区分不同的生物硫醇。现时只有极少数的半胱氨酸荧光探针可以高选择性地检测半胱氨酸、高半胱氨酸和谷胱甘肽。因此,开发用于选择性半胱氨酸检测的荧光探针具有重要意义。

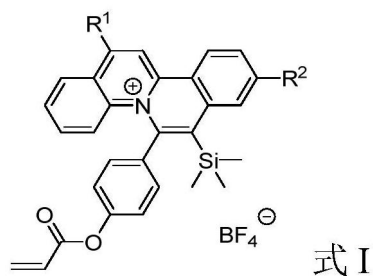
发明内容

[0005] 鉴于上述现有技术的不足,本发明的目的在于提供一种半胱氨酸荧光探针及其制备方法与应用,旨在解决现有技术中半胱氨酸荧光探针难以同时区分不同的生物硫醇的问题。

[0006] 本发明的技术方案如下:

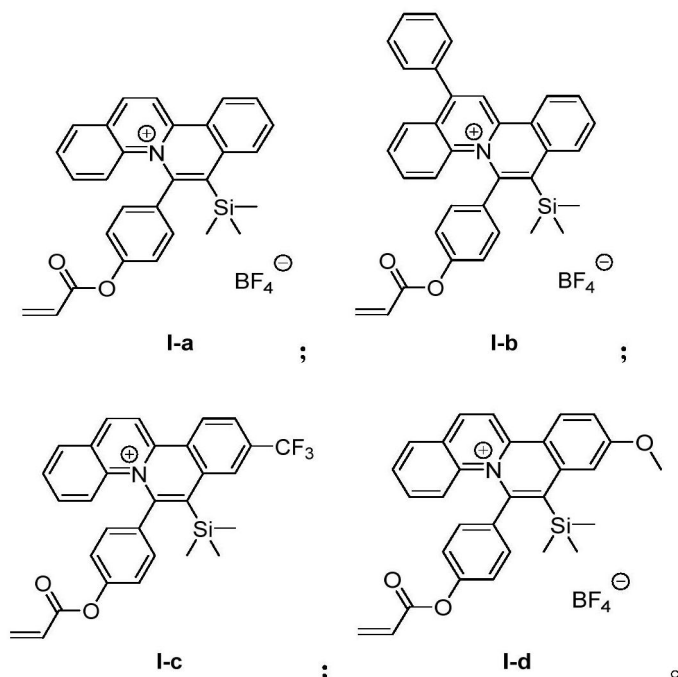
[0007] 本发明的第一方面,提供一种半胱氨酸荧光探针,包括喹啉鎓离子骨架、通过碳硅单键与所述喹啉鎓离子骨架结构键合的三甲基硅基、通过碳碳单键与所述喹啉鎓离子骨架结构相连的丙烯酸对苯酯基团、以及抗衡离子(即 BF_4^-),所述半胱氨酸荧光探针的结构通式如式I所示:

[0008]

[0009] 其中, R^1 选自氢或苯基, R^2 选自氢、三氟甲基或甲氧基。

[0010] 优选地, 所述半胱氨酸荧光探针选自如下结构式中的一种:

[0011]

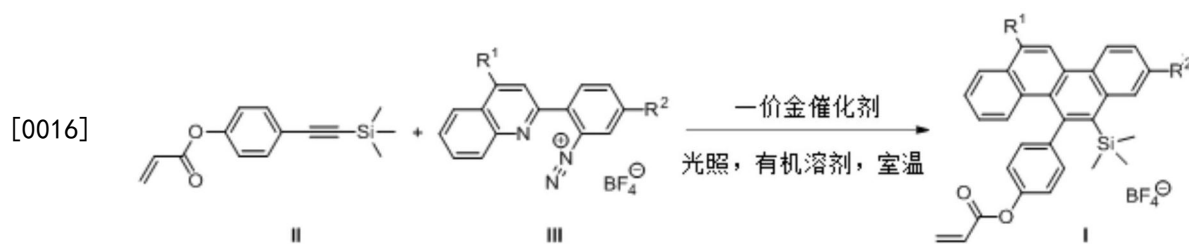


[0012] 本发明第一方面提供的半胱氨酸荧光探针, 半胱氨酸荧光探针的结构通式如式 I 所示, 半胱氨酸荧光探针包括喹啉鎓离子为骨架, 通过碳硅单键与所述喹啉鎓离子骨架结构键合的三甲基硅基、以及通过碳碳单键与所述喹啉鎓离子骨架结构相连的丙烯酸对苯酯基团以及抗衡离子。荧光团的羟基被丙烯酸酯保护, 带有最大发射波长为 412-433nm 的荧光。加入半胱氨酸时, 半胱氨酸与丙烯酸酯的碳碳双键发生亲核加成反应, 然后进行环化裂解反应, 导致荧光团的羟基脱保护, 因此, 探针中的荧光团喹啉鎓离子骨架被淬灭。高半胱氨酸 (Hcy) 和谷胱甘肽 (GSH) 与丙烯酸酯的裂解反应非常缓慢, 因此只表现出轻微的荧光变化。该半胱氨酸荧光探针的荧光强度在加入半胱氨酸时几乎完全淬灭, 其荧光强度与半胱氨酸浓度以线性关系相应下降, 对半胱氨酸有高选择性, 可以从该三种生物硫醇中区分出半胱氨酸 (Cys), 适合广泛应用于活细胞中半胱氨酸的检测。

[0013] 本发明的第二方面, 提供一种本发明所述的半胱氨酸荧光探针的制备方法, 其中, 包括步骤:

[0014] 将化合物 II (三甲基硅基炔衍生物)、化合物 III (重氮盐) 和一价金催化剂溶于有机溶剂中, 在光照射和室温 (指的是 16°C-25°C) 条件下进行反应, 得到目标化合物 I, 即所述半胱氨酸荧光探针;

[0015] 上述反应路线如下所示:



[0017] 其中, R^1 选自氢或苯基, R^2 选自氢、三氟甲基或甲氧基。

[0018] 本发明第二方面提供的半胱氨酸荧光探针的制备方法, 该制备方法以两种小分子化合物为反应物, 在一价金催化剂的作用下进行催化加成反应, 该制备方法反应过程简单方便, 操作步骤简单, 反应速率高, 可以有效、快速得到半胱氨酸荧光探针, 有效提高生产效率, 降低生产成本。

[0019] 优选地, 所述化合物II、化合物III和一价金催化剂的摩尔比为 $(1.0 \sim 1.5) : (1.5 \sim 2.0) : (0.05 \sim 0.1)$ 。

[0020] 优选地, 所述反应的时间为16~18小时。

[0021] 优选地, 所述光照射为 ≥ 3 瓦的蓝色LED灯照射, 如16瓦的蓝色LED灯照射。

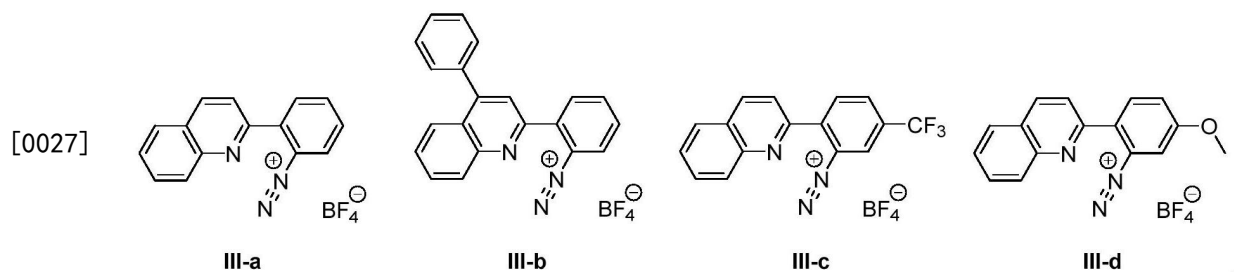
[0022] 本发明中, 所述一价金催化剂为一价金配合物。优选地, 所述一价金催化剂为三(4-三氟甲基苯基)氯化金或三苯基膦氯化金($(C_6H_5)_3PAuCl$)。

[0023] 优选地, 所述有机溶剂为乙腈, 或所述有机溶剂选自甲醇、乙醇、丙醇、丁醇、甲苯、氯仿中的至少一种与乙腈组成的混合溶液。

[0024] 优选地, 所述半胱氨酸荧光探针的制备方法, 包括如下步骤: 在惰性气体氮气保护下, 将化合物II、化合物III和一价金催化剂按摩尔比1.0:1.5:0.05用5mL乙腈溶于30mL的反应管中, 在16瓦的蓝色LED灯和室温条件下进行催化环加成反应, 反应16个小时后, 旋蒸除去有机溶剂, 所得残余物, 过硅胶柱, 用二氯甲烷和甲醇的混合溶液进行梯度洗脱, 合并旋蒸除去溶剂, 加入二氯甲烷后用水多次萃取, 合并水相, 最后旋蒸除去水, 得到化合物I (即半胱氨酸荧光探针)。

[0025] 本发明中, 所述化合物II的制备, 可以通过现有技术文献制备得到, 在此不再赘述。

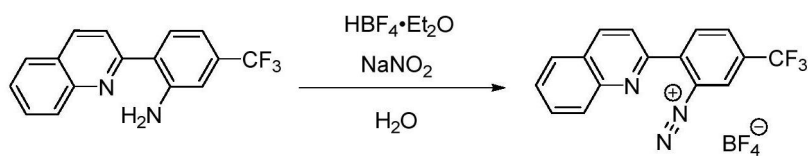
[0026] 优选地, 所述化合物III可以选自如下结构的化合物III-a、III-b、III-c和III-d中的任一种:



[0028] 其中, 三甲基硅基炔衍生物III-a的制备, 可以通过现有技术文献制备得到, 在此不再赘述。

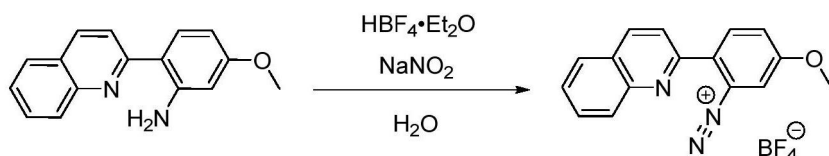
[0029] 其中, 三甲基硅基炔衍生物III-c和III-d的制备, 其制备方法为: 在25mL圆底烧瓶中加入2mL水和氨基喹啉(2mmol), 在 -5°C 冰盐浴下加入 $HBF_4 \cdot Et_2O$, 搅拌2分钟。接着缓慢滴加 $NaNO_2$ (207mg, 3mmol, 1.5eq., 0.67L/mol) 的水溶液, 搅拌15分钟后转移到室温下继续搅

拌3小时。反应完全后,过滤,用4mL无水乙醇洗一遍,用乙醚洗至无原料剩余即可,分别得到三甲基硅基炔衍生物III-c和III-d。



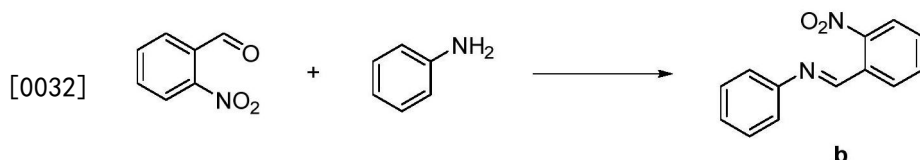
III-c

[0030]



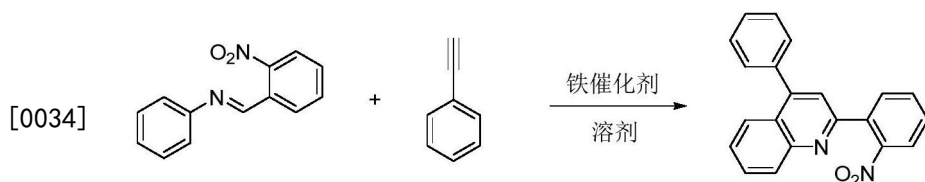
III-d

[0031] 其中,三甲基硅基炔衍生物III-b的制备,其制备方法为:在50mL干燥圆底烧瓶中加入邻硝基苯甲醛(6.04g,40mmol,1eq.)和苯胺(3.73g,40mmol,1eq.),70℃加热搅拌后,经薄层色谱监测反应进程。反应完全后,加入20mL无水乙醇进行重结晶,得到化合物b。



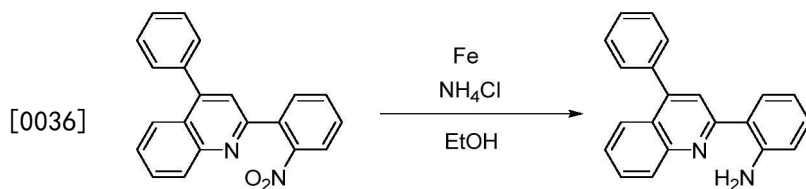
b

[0033] 在250mL干燥的圆底烧瓶中加入9g亚胺和100mL 1,2-二氯乙烷,再加入苯乙炔(4.9g,48mmol,1.2eq.),搅拌下分批加入三氯化铁催化剂(6.49g,40mmol,1eq.),85℃回流过夜。反应后,经硅藻土过滤后,旋蒸除去有机溶剂,所得残余物,过硅胶柱,用石油醚和醋酸乙酯的混合溶液进行梯度洗脱,合并旋蒸除去溶剂,得到化合物c。



c

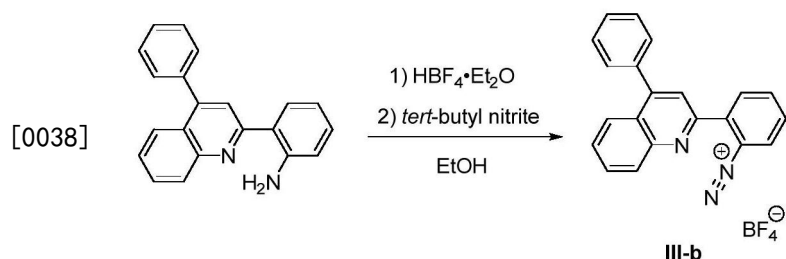
[0035] 在500mL圆底烧瓶中加入硝基苯和氯化铵(1.6g,29.8mmol,0.75eq.),接着加入200mL无水乙醇和20mL蒸馏水,80℃加热回流,在搅拌条件下分批加入铁粉(12.2g,218.7mmol,5.5eq.),加毕后反应5小时。反应后经硅藻土过滤,用水洗涤三次,用无水硫酸钠干燥后,旋蒸除去有机溶剂,所得残余物,过硅胶柱,用石油醚和醋酸乙酯的混合溶液进行梯度洗脱,合并旋蒸除去溶剂,得到化合物d。



d

[0037] 在25mL圆底烧瓶中加入2mL无水乙醇和氨基喹啉(593mg,2mmol,1eq.),在-5℃冰盐浴下加入 $\text{HBF}_4 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (648mg,2mmol,2eq.),搅拌2分钟。接着缓慢滴加亚硝酸叔丁酯

(413mg, 2mmol, 2eq.), 搅拌15分钟后转移到室温下继续搅拌3小时。反应完全后, 加入10mL 乙醚过滤, 再用乙醚洗至无原料剩余即可, 得到化合物III-b。



[0039] 本发明的第三方面, 提供一种半胱氨酸荧光探针或者由如上所述的制备方法制备的半胱氨酸荧光探针在半胱氨酸的荧光检测中的应用。

[0040] 本发明第三方面提供的半胱氨酸荧光探针或者由所述的制备方法制备的半胱氨酸荧光探针在半胱氨酸的荧光检测中的应用。由于该半胱氨酸荧光探针的丙烯酸酯结构对半胱氨酸具有高选择性, 可以从该三种生物硫醇中区分出半胱氨酸, 因此, 得到的半胱氨酸荧光探针在半胱氨酸的荧光检测中检测灵敏度高, 效果佳, 有利于广泛应用。

附图说明

[0041] 图1为本发明实施例1得到的半胱氨酸荧光探针的紫外吸收光谱图。

[0042] 图2为本发明实施例1得到的半胱氨酸荧光探针的荧光光谱图。

[0043] 图3为本发明实施例1得到的半胱氨酸荧光探针加入半胱氨酸后的荧光滴定。

[0044] 图4为本发明实施例1得到的半胱氨酸荧光探针随半胱氨酸浓度增加的荧光变化。

[0045] 图5为本发明实施例1得到的半胱氨酸荧光探针在反应浓度为1 μ M时的荧光光谱图。

[0046] 图6为本发明实施例1得到的半胱氨酸荧光探针加入不同氨基酸后的荧光变化。

[0047] 图7为本发明实施例1得到的半胱氨酸荧光探针在分别加入半胱氨酸、高半胱氨酸和谷胱甘肽后随时间变化的荧光光谱图。

[0048] 图8为本发明实施例1得到的半胱氨酸荧光探针加入不同金属盐后的荧光变化。

[0049] 图9为本发明实施例1得到的半胱氨酸荧光探针I-a的细胞毒性测定。

[0050] 图10为本发明实施例1得到的半胱氨酸荧光探针I-a的细胞成像。

[0051] 图11为本发明实施例1得到的半胱氨酸荧光探针I-a在细胞中加入半胱氨酸前后的荧光强度对比图。

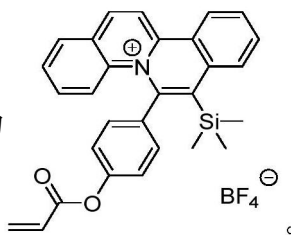
具体实施方式

[0052] 本发明提供一种半胱氨酸荧光探针及其制备方法与应用, 为使本发明的目的、技术方案及效果更加清楚、明确, 以下对本发明进一步详细说明。应当理解, 此处所描述的具体实施例仅仅用以解释本发明, 并不用于限定本发明。

[0053] 实施例1

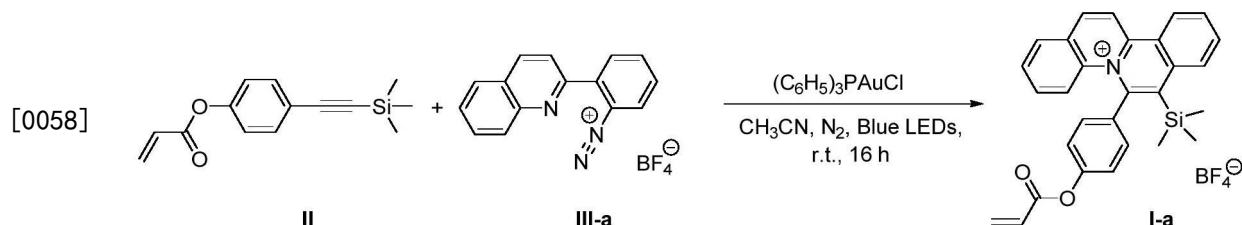
[0054] 半胱氨酸荧光探针I-a及其制备方法

[0055] 半胱氨酸荧光探针I-a的结构式为



[0056] 半胱氨酸荧光探针I-a的制备方法

[0057] 半胱氨酸荧光探针I-a的制备方法如以下反应式所示:



[0059] 半胱氨酸荧光探针I-a的制备方法包括如下步骤:在惰性气体氮气保护下,将化合物II、化合物III-a和催化剂三苯基膦氯化金按摩尔比例1.0:1.5:0.05用5mL乙腈溶于30mL的反应管中,在16瓦的蓝色LED灯和室温条件下进行催化环加成反应,反应16个小时后,旋蒸除去有机溶剂,所得残余物,过硅胶柱,用二氯甲烷和甲醇的混合溶液进行梯度洗脱,合并旋蒸除去溶剂,加入二氯甲烷后用水多次萃取,合并水相,最后旋蒸除去水,最终得到黄色固体产物半胱氨酸荧光探针I-a,产率为31%。

[0060] 半胱氨酸荧光探针I-a的NMR结果:

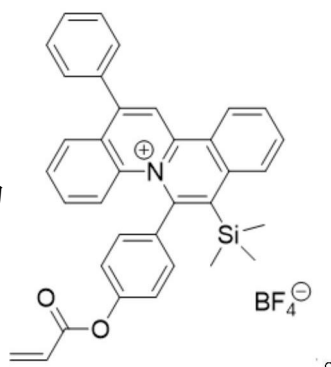
[0061] ^1H NMR (400MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 9.35 (d, $J=9.0\text{Hz}$, 1H), 9.16 (d, $J=8.5\text{Hz}$, 1H), 9.11 (d, $J=9.0\text{Hz}$, 1H), 8.44 (d, $J=8.2\text{Hz}$, 1H), 8.36-8.31 (m, 2H), 8.22 (t, $J=7.6\text{Hz}$, 1H), 8.10 (t, $J=7.8\text{Hz}$, 1H), 7.75 (t, $J=7.6\text{Hz}$, 1H), 7.67-7.60 (m, 2H), 7.44-7.32 (m, 3H), 6.64-6.55 (m, 1H), 6.59 (dd, $J=16.7\text{Hz}$, 1.3Hz, 1H), 6.45 (dd, $J=17.3$, 10.2Hz, 1H), 6.21 (dd, $J=10.2$, 1.3Hz, 1H), 0.10 (s, 9H) .

[0062] HRMS (ESI) $\text{C}_{29}\text{H}_{26}\text{NO}_2\text{Si}^+$, 理论计算值448.1727, 实测值448.1736.

[0063] 实施例2

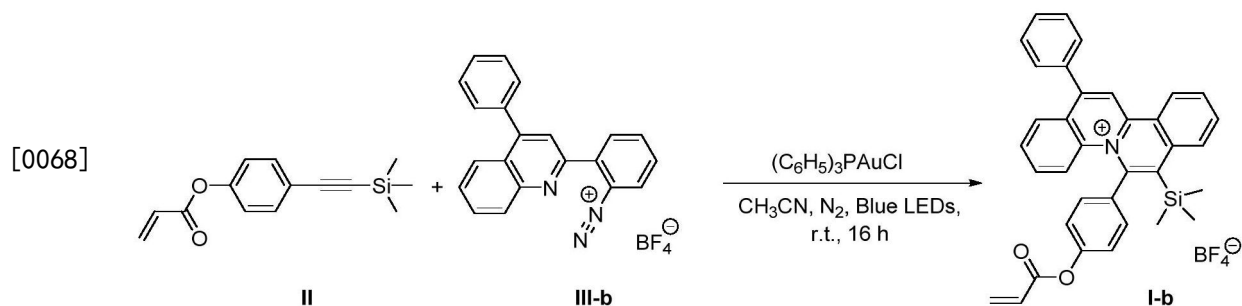
[0064] 半胱氨酸荧光探针I-b及其制备方法

[0065] 半胱氨酸荧光探针I-b的结构式为



[0066] 半胱氨酸荧光探针I-b的制备方法

[0067] 半胱氨酸荧光探针I-b的制备方法如以下反应式所示:



[0069] 半胱氨酸荧光探针I-b的制备方法的具体操作参见实施例1所示,得到黄褐色固体产物半胱氨酸荧光探针I-b,产率为4%。

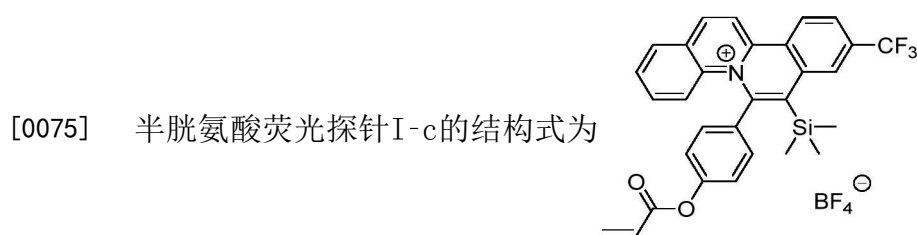
[0070] 半胱氨酸荧光探针I-b的NMR结果:

[0071] ^1H NMR (400MHz, CD_2Cl_2) δ 8.84 (d, $J=8.4\text{Hz}$, 1H), 8.76 (s, 1H), 8.67 (d, $J=7.8\text{Hz}$, 1H), 8.31 (d, $J=7.2\text{Hz}$, 1H), 8.21 (d, $J=8.7\text{Hz}$, 1H), 8.15-8.00 (m, 4H), 7.84-7.81 (m, 2H), 7.74 (dq, $J=6.4, 3.1\text{Hz}$, 4H), 7.59 (d, $J=3.8\text{Hz}$, 1H), 7.47-7.43 (m, 3H), 7.37 (d, $J=2.3\text{Hz}$, 2H), 0.08 (s, 9H).

[0072] HRMS (ESI) $\text{C}_{35}\text{H}_{30}\text{NO}_2\text{Si}^+$, 理论计算值524.2040, 实测值524.1973。

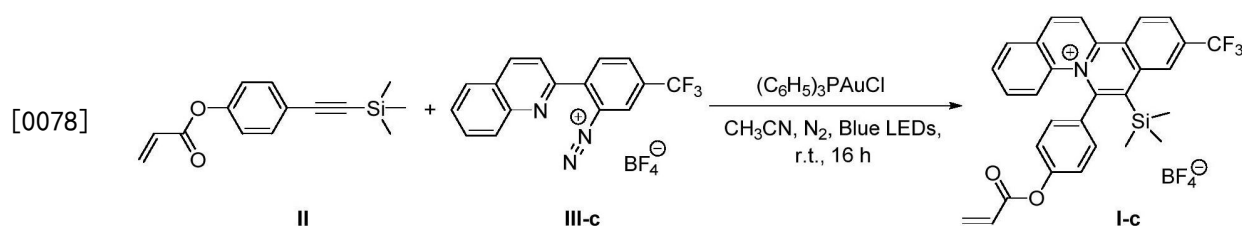
[0073] 实施例3

[0074] 半胱氨酸荧光探针I-c及其制备方法



[0076] 半胱氨酸荧光探针I-c的制备方法

[0077] 半胱氨酸荧光探针I-c的制备方法如以下反应式所示,



[0079] 半胱氨酸荧光探针I-c的制备方法的具体操作参见实施例1所示,得到橙黄色固体产物半胱氨酸荧光探针I-c,产率为56%。

[0080] 半胱氨酸荧光探针I-c的NMR结果:

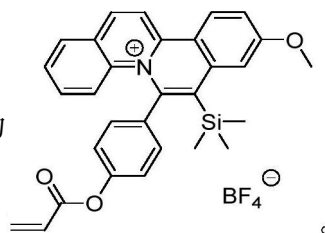
[0081] ^1H NMR (400MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 9.47 (d, $J=9.0\text{Hz}$, 1H), 9.39 (d, $J=8.8\text{Hz}$, 1H), 9.25 (d, $J=8.9\text{Hz}$, 1H), 8.52 (s, 1H), 8.42 (dd, $J=3.9, 1.5\text{Hz}$, 1H), 8.40 (dd, $J=3.3, 1.6\text{Hz}$, 1H), 7.81 (t, $J=7.7\text{Hz}$, 1H), 7.68 (d, $J=9.0\text{Hz}$, 1H), 7.64 (d, $J=8.5\text{Hz}$, 2H), 7.48 (ddd, $J=8.8, 7.0, 1.5\text{Hz}$, 1H), 7.38 (d, $J=8.6\text{Hz}$, 2H), 6.59 (dd, $J=17.2, 1.3\text{Hz}$, 1H), 6.45 (dd, $J=17.2, 10.3\text{Hz}$, 1H), 6.21 (dd, $J=10.3, 1.4\text{Hz}$, 1H), 0.11 (s, 9H).

[0082] HRMS (ESI) $\text{C}_{30}\text{H}_{25}\text{F}_3\text{NO}_2\text{Si}^+$, 理论计算值516.1601, 实测值516.1607。

[0083] 实施例4

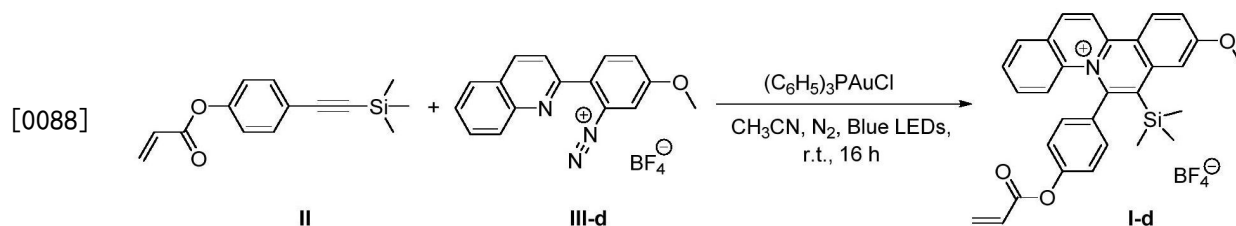
[0084] 半胱氨酸荧光探针I-d及其制备方法

[0085] 半胱氨酸荧光探针I-d的结构式为



[0086] 半胱氨酸荧光探针I-d的制备方法

[0087] 半胱氨酸荧光探针I-d的制备方法如以下反应式所示，



[0089] 半胱氨酸荧光探针I-d的制备方法的具体操作参见实施例1所示,得到深红色固体产物半胱氨酸荧光探针I-d,产率为7%。

[0090] 半胱氨酸荧光探针I-d的NMR结果:

[0091] ^1H NMR (400MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 9.20 (d, $J=9.1\text{Hz}$, 1H), 9.13 (d, $J=9.2\text{Hz}$, 1H), 8.95 (d, $J=9.1\text{Hz}$, 1H), 8.27 (d, $J=8.1\text{Hz}$, 1H), 7.77-7.62 (m, 5H), 7.59-7.52 (m, 2H), 7.36 (d, $J=8.6\text{Hz}$, 2H), 6.59 (d, $J=17.3\text{Hz}$, 1H), 6.45 (dd, $J=17.2, 10.2\text{Hz}$, 1H), 6.21 (dd, $J=10.3, 1.5\text{Hz}$, 1H), 4.14 (s, 3H), 0.12 (s, 9H)。

[0092] HRMS (ESI) $\text{C}_{30}\text{H}_{28}\text{NO}_3\text{Si}^+$, 理论计算值478.1833, 实测值478.1837。

[0093] 实施例5

[0094] 依上述实验操作合成的半胱氨酸荧光探针均能在紫外光或蓝紫色可见光波段被激发,发射出从蓝光到绿色荧光。具体光学参数,包括最大吸收波长、最大发射波长、斯托克斯位移及量子产率如下表1所示。

[0095] 表1

[0096]	半胱氨酸荧光 探针	最大吸收 波长 (nm)	最大发射 波长 (nm)	斯托克斯位 移 (cm ⁻¹)	量子产率 Φ
	I-a	420	495	3608	0.43
	I-b	433	527	4119	0.20
	I-c	426	511	3905	0.34
	I-d	413	494	3970	0.11

[0097] 性质测试

[0098] 实施例1得到的半胱氨酸荧光探针I-a的光学性质测试。

[0099] 测试方法:将半胱氨酸荧光探针溶解于乙腈中,制备得到1mM储备溶液,将半胱氨酸(Cys)溶解于Milli-Q[®]水中,制备得到100mM储备溶液。将半胱氨酸荧光探针在CH₃CN/H₂O溶液(1:1,v/v,50mM pH 7.4PBS缓冲液)中稀释至5 μ M,记录紫外可见光谱和荧光光谱。

[0100] 将半胱氨酸荧光探针(80 μ L),半胱氨酸(16 μ L),乙腈(1920 μ L),Milli-Q水(984 μ L)和PBS缓冲液(1000 μ L,50mM,pH 7.4)在4mL透明样品瓶混合。将反应混合物在25℃下保持1小时。1小时后,将反应混合物用PBS缓冲液中在石英分光液槽中替代至5 μ M,记录荧光光谱(激发波长为420nm)。

[0101] 实施例1得到的半胱氨酸荧光探针I-a的敏感性测试。

[0102] 测试方法:将半胱氨酸荧光探针溶解于乙腈中,制备得到1mM储备溶液,将半胱氨酸(Cys)溶解于Milli-Q[®]水中,制备得到100mM储备溶液。在CH₃CN/H₂O溶液(1:1,v/v,50mM pH 7.4PBS缓冲液)中,对半胱氨酸荧光探针(20 μ M)在不同浓度的半胱氨酸(2-50当量)进行荧光滴定。反应混合物在4mL透明样品瓶混合,在25℃下保持1小时。1小时后,将反应混合物用PBS缓冲液中在石英分光液槽中稀释至5 μ M,记录荧光光谱(激发波长为420nm)。

[0103] 实施例1得到的半胱氨酸荧光探针I-a对氨基酸的选择性测试。

[0104] 测试方法:将半胱氨酸荧光探针溶解于乙腈中,制备得到1mM储备溶液,将不同氨基酸包括半胱氨酸(Cys)、高半胱氨酸(Hcy)、谷胱甘肽(GSH)、缬氨酸(Val)、谷氨酸(Glu)、亮氨酸(Leu)、蛋氨酸(Met)、天冬酰胺(Asn)、丙氨酸(Ala)、组氨酸(His)、色氨酸(Trp)、苯丙氨酸(Phe)、丝氨酸(Ser)、赖氨酸(Lys)、天冬氨酸(Asp)、异亮氨酸(Ile)、酪氨酸(Tyr)、脯氨酸(Pro)、甘氨酸(Gly)、苏氨酸(Thr)、谷氨酰胺(Gln)、精氨酸(Arg)分别溶解于Milli-Q[®]水中,制备得到100mM储备溶液。将荧光探针(80 μ L),不同氨基酸(16 μ L),乙腈(1920 μ L),Milli-Q[®]水(984 μ L)和PBS缓冲液(1000 μ L,50mM,pH 7.4)在4mL透明样品瓶混

合。将反应混合物在25℃下保持1小时。1小时后,将反应混合物用PBS缓冲液中在石英分光液槽中替代至5μM,记录荧光光谱(激发波长为420nm)。

[0105] 将半胱氨酸荧光探针溶解于乙腈中,制备得到1mM储备溶液,将半胱氨酸(Cys)、高半胱氨酸(Hcy)、谷胱醇肽(GSH)分别在 Milli-Q® 水中溶解来制备100mM储备溶液。将荧光探针(80μL),不同氨基酸(16μL),乙腈(1920μL), Milli-Q® 水(984μL)和PBS缓冲液(1000μL, 50mM, pH 7.4)在石英分光液槽混合,记录荧光光谱(激发波长为420nm)。

[0106] 实施例1得到的半胱氨酸荧光探针I-a对其他可能与生物有关的阴离子和阳离子的选择性测试。

[0107] 测试方法:将半胱氨酸荧光探针溶解于乙腈中,制备得到1mM储备溶液,将不同金属盐包括氯化钠(NaCl)、氯化钾(KCl)、氯化铁(FeCl₃)、氯化铜(CuCl₂)、氯化锌(ZnCl₂)、硫酸镁(MgSO₄)、硫酸钾(K₂SO₄)、硫酸铝(Al₂(SO₄)₃)、碘化亚铜(CuI)、碘化钠(NaI)、碘化钾(KI)、溴化铜(CuBr₂)、溴化镍(NiBr₂)、硝酸钾(KNO₃)、硝酸镍(Ni(NO₃)₂)、硝酸铁(Fe(NO₃)₂)、磷酸二氢钠(NaH₂PO₄)、磷酸一氢钠(Na₂HPO₄)溶解于 Milli-Q® 水中,制备得到100mM储备溶液。将荧光探针(80μL),不同氨基酸(16μL),乙腈(1920μL), Milli-Q® 水(984μL)和PBS缓冲液(1000μL, 50mM, pH 7.4)在4mL透明样品瓶混合。将反应混合物在25℃下保持1小时。1小时后,将反应混合物用PBS缓冲液中在石英分光液槽中替代至5μM,记录随时间变化的荧光光谱(激发波长为420nm,发射波长为495nm)。

[0108] 实施例1得到的半胱氨酸荧光探针I-a的细胞毒性测定。

[0109] 提供HeLa细胞系,补充44mM碳酸氢钠(Sigma-Aldrich), 10%v/v胎牛血清(Gibco)和100U/ml青霉素(Gibco)的Dulbecco改良的Eagle's Medium (DMEM) (Gibco)和100ug/ml链霉素(Gibco)培养,温度为37℃,含5%CO₂。在细胞毒性测定实验前一天,将5×10³细胞接种到96孔板中,将细胞与0.4μM至100μM的pH荧光探针II在37℃, 5%CO₂下孵育72小时。温育后,除去培养基并用新鲜培养基代替。将10μL MTS混合物(0.92mg/ml PMS, Sigma-Aldrich: 2mg/ml MTS, Promega, 1:20)添加到每个孔中。将平板在37℃和5%CO₂中孵育1小时,测定490nm处的吸光度并计算IC₅₀数值。

[0110] 实施例1得到的半胱氨酸荧光探针I-a的细胞成像。

[0111] 在细胞成像实验前一天,将HeLa细胞接种在共聚焦培养皿中。将细胞与100μM半胱氨酸或PBS缓冲液孵育30分钟,然后与半胱氨酸荧光探针I-a孵育2小时。在共聚焦显微镜(Leica TCS SP8 MP)下检查图像。

[0112] 结果分析

[0113] 实施例1得到的半胱氨酸荧光探针I-a的光学性质测试,测试结果如图1~图2所示。

[0114] 图1为本发明实施例1得到的半胱氨酸荧光探针I-a的紫外吸收光谱图。在没有半胱氨酸的情况下,可以观察到最大吸收波长为420nm。在添加20当量的半胱氨酸后,420nm处的吸收强度下降。

[0115] 图2为本发明实施例1得到的半胱氨酸荧光探针的荧光光谱图。当被最大吸收波长激发时,没有半胱氨酸的情况下在495nm处观察到很强的发射峰,其光度在添加20当量的半

胱氨酸后急剧下降。

[0116] 实施例1得到的半胱氨酸荧光探针I-a的敏感性,测试结果如图3~5所示。

[0117] 图3为本发明实施例1得到的半胱氨酸荧光探针I-a加入半胱氨酸后的荧光滴定。加入0.5当量的半胱氨酸导致495nm处荧光发射的强度减少,发射强度在加入20-50当量的半胱氨酸时几乎完全淬灭。与探针本身的光度相比,荧光发射强度减少了约8倍。

[0118] 图4为本发明实施例1得到的半胱氨酸荧光探针I-a随半胱氨酸浓度增加的荧光变化。当半胱氨酸浓度在0~100 μM 之间时,荧光探针的荧光强度以线性关系 (R^2 值 = 0.9905) 相应下降。

[0119] 图5为本发明实施例1得到的半胱氨酸荧光探针I-a在反应浓度为1 μM 时的荧光光谱图。在反应前,495nm处荧光发射的强度为50A.U.;在加入20当量的半胱氨酸后,发射强度减少至20A.U.,表明实施例1得到的半胱氨酸荧光探针I-a能在低反应浓度下进行半胱氨酸检测。

[0120] 实施例1得到的半胱氨酸荧光探针I-a对不同氨基酸的选择性,测试结果如图6~7所示。

[0121] 图6为本发明实施例1得到的半胱氨酸荧光探针I-a加入不同氨基酸后的荧光变化。根据反应前后荧光比 (F_0/F),在相同反应条件下,其他氨基酸即使在高浓度(20当量,400 μM)下均未引起荧光变化,而高半胱氨酸和谷胱甘肽只表现出轻微的影响,表明实施例1得到的半胱氨酸荧光探针I-a对半胱氨酸有高选择性。

[0122] 图7为本发明实施例1得到的半胱氨酸荧光探针I-a在分别加入半胱氨酸、高半胱氨酸和谷胱甘肽后随时间变化的荧光光谱图。与高半胱氨酸(Hcy)和谷胱甘肽(GSH)相比,半胱氨酸(Cys)导致最快的荧光淬灭。因此半胱氨酸荧光探针可以从该三种生物硫醇中区分出半胱氨酸(Cys)。

[0123] 实施例1得到的半胱氨酸荧光探针I-a对其他可能与生物有关的阴离子和阳离子的选择性,测试结果如图8所示。

[0124] 图8为本发明实施例1得到的半胱氨酸荧光探针加入不同金属盐后的荧光变化。根据反应前后荧光比 (F_0/F),在相同反应条件下,不同离子包括 Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Cu^+ 、 Fe^{3+} 、 Zn^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Cl^- 、 Br^- 、 I^- 、 SO_4^{2-} 、 NO_3^- 、 HPO_4^{2-} 、 H_2PO_4^- 并未引起荧光变化,表明实施例1得到的半胱氨酸荧光探针I-a在存在不同离子的环境下对半胱氨酸仍有高选择性。

[0125] 实施例1得到的半胱氨酸荧光探针I-a的细胞毒性测定。IC50值通过GraphPad Prism计算,如图9所示,IC50为7.319 μM 。

[0126] 实施例1得到的半胱氨酸荧光探针I-a的细胞成像。

[0127] 采用共聚焦显微镜(Leica TCS SP8 MP)下检查图像,如图10所示,图10中A、B和C为半胱氨酸荧光探针I-a在与100 μM 半胱氨酸一起孵育的不同选定细胞中的荧光显微镜图像,图10中D、E和F为半胱氨酸荧光探针I-a在单独的不同选定细胞的荧光显微镜图像。相对荧光通过ImageJ测量,如图11所示,在没有半胱氨酸的情况下,细胞的相对荧光为约100RFU;在100 μM 半胱氨酸的环境下,细胞的相对荧光下降至低于50RFU,表明半胱氨酸荧光探针I-a能成功检测活细胞中的半胱氨酸。

[0128] 应当理解的是,本发明的应用不限于上述的举例,对本领域普通技术人员来说,可以根据上述说明加以改进或变换,所有这些改进和变换都应属于本发明所附权利要求的保

护范围。

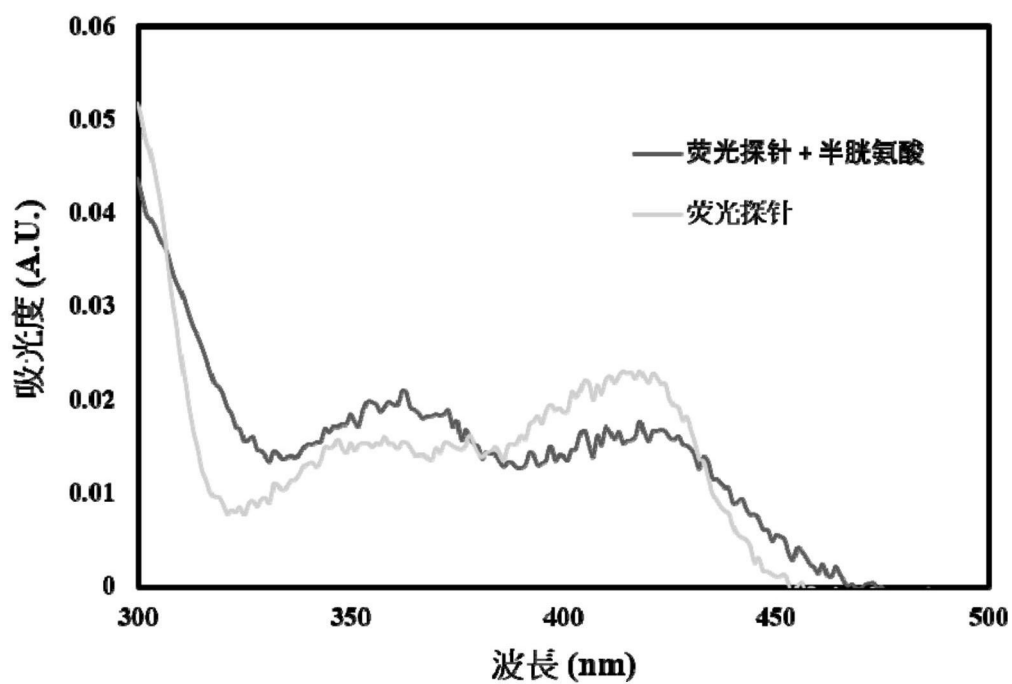


图1

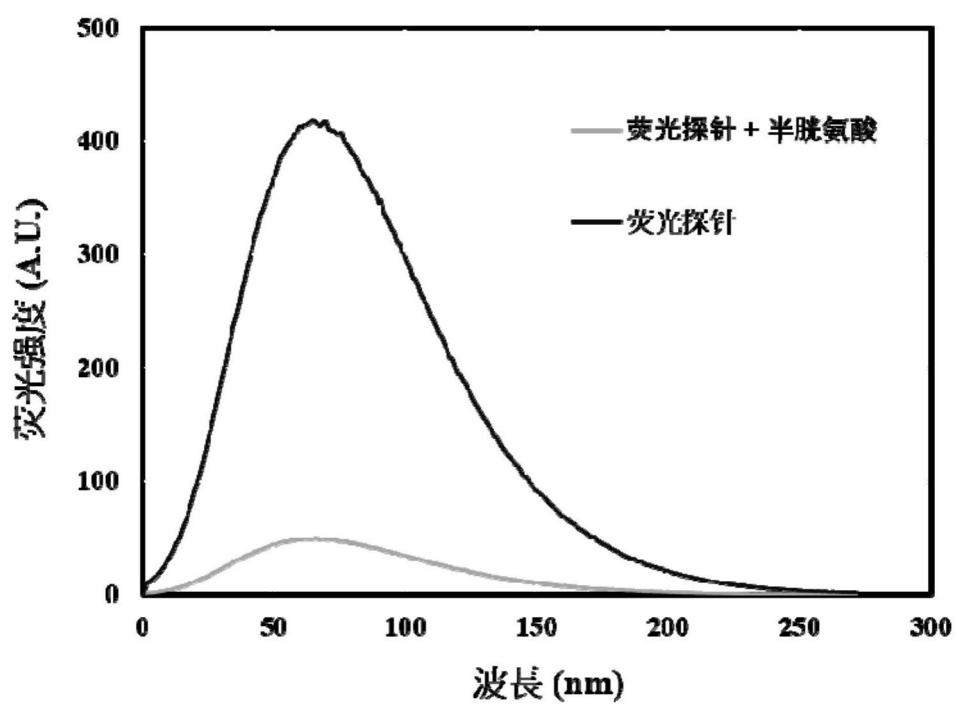


图2

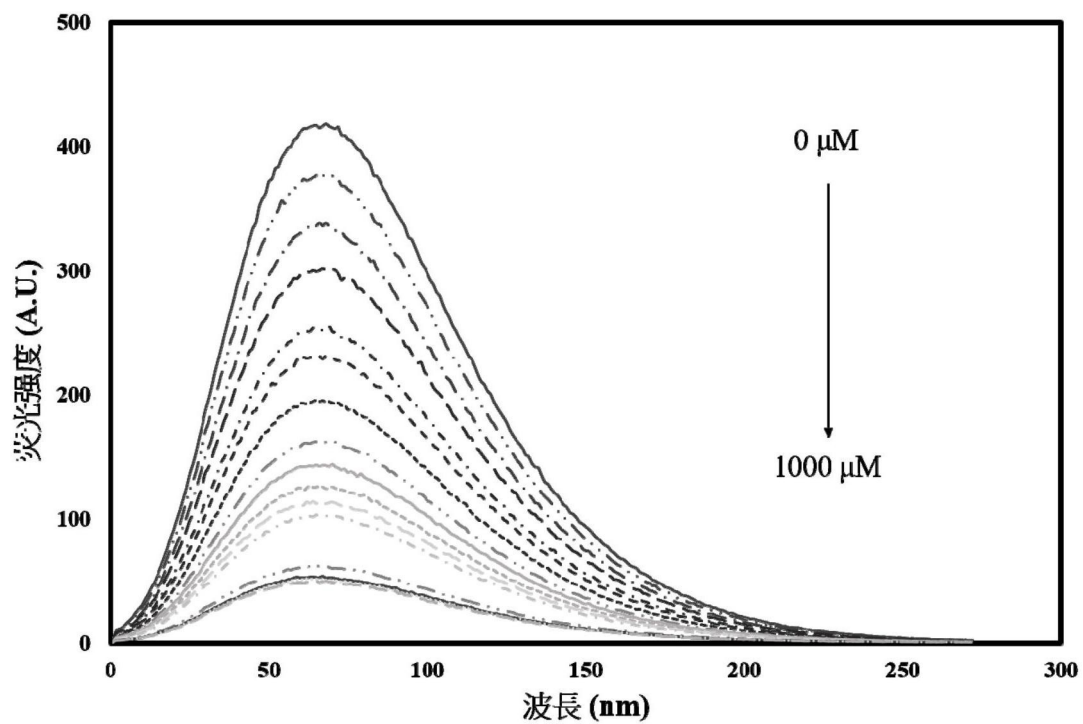


图3

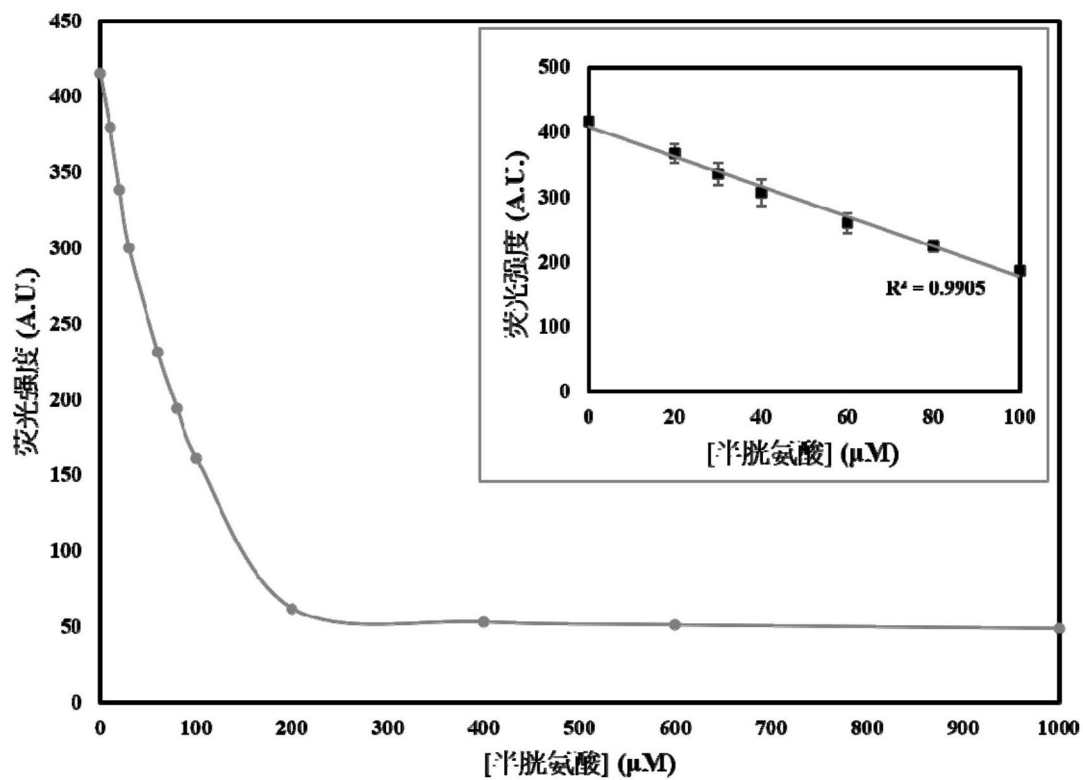


图4

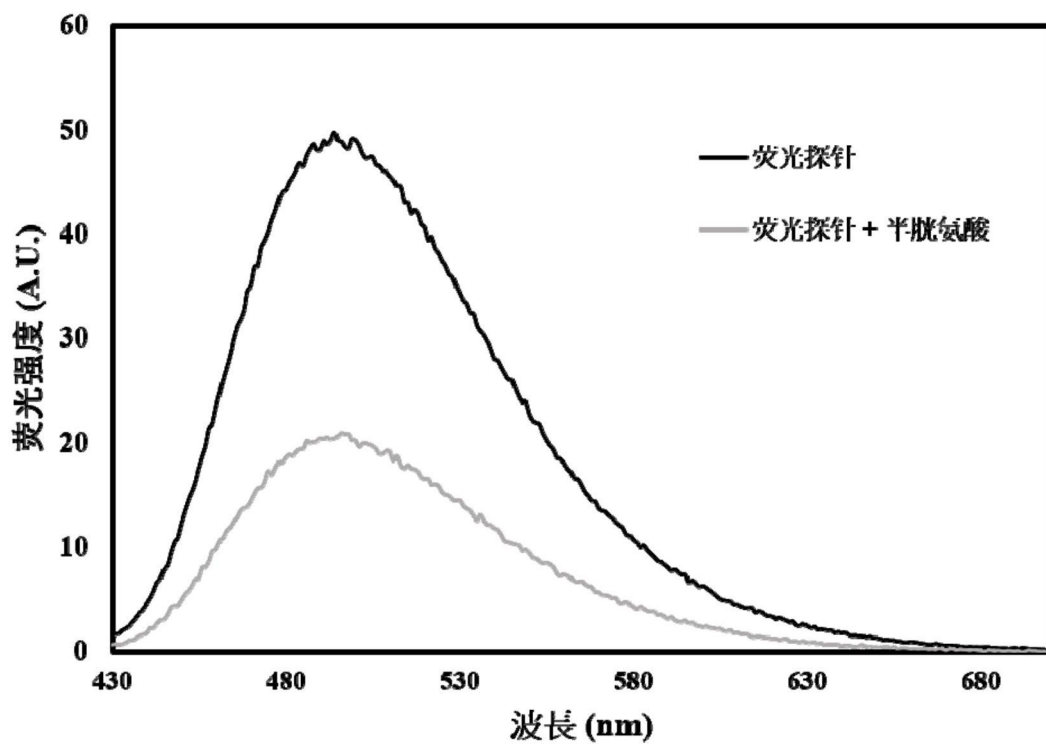


图5

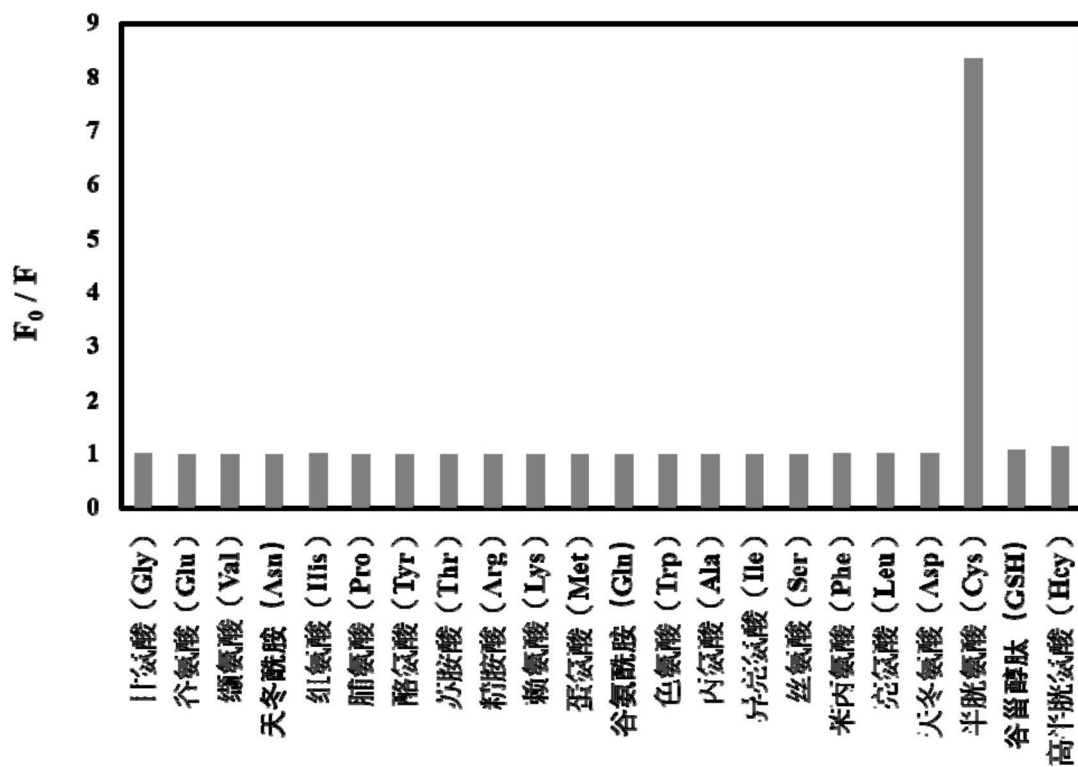


图6

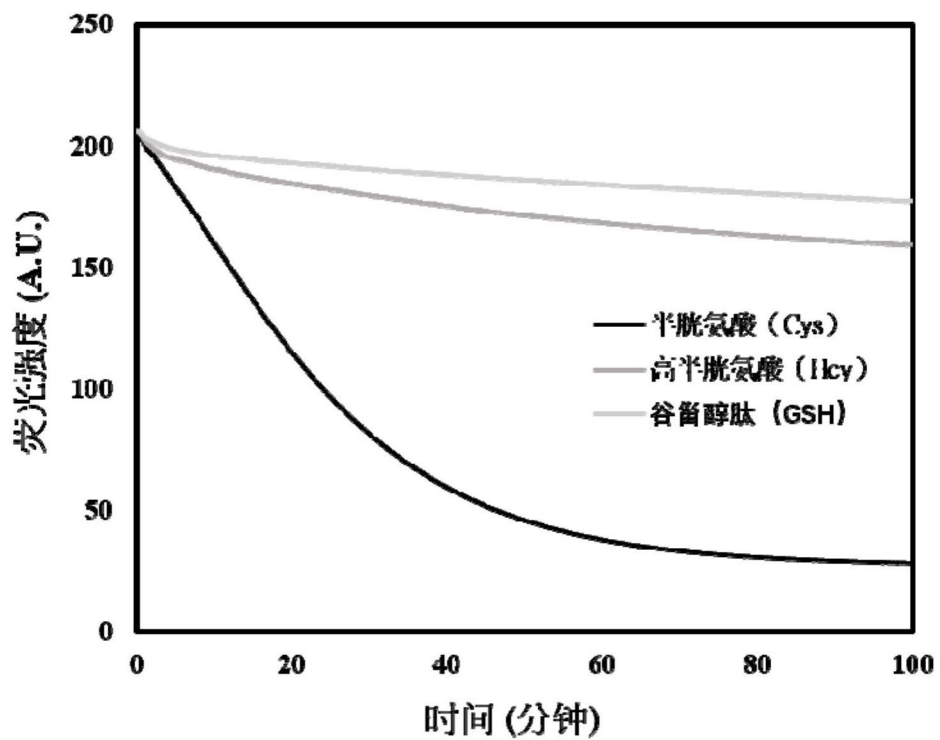


图7

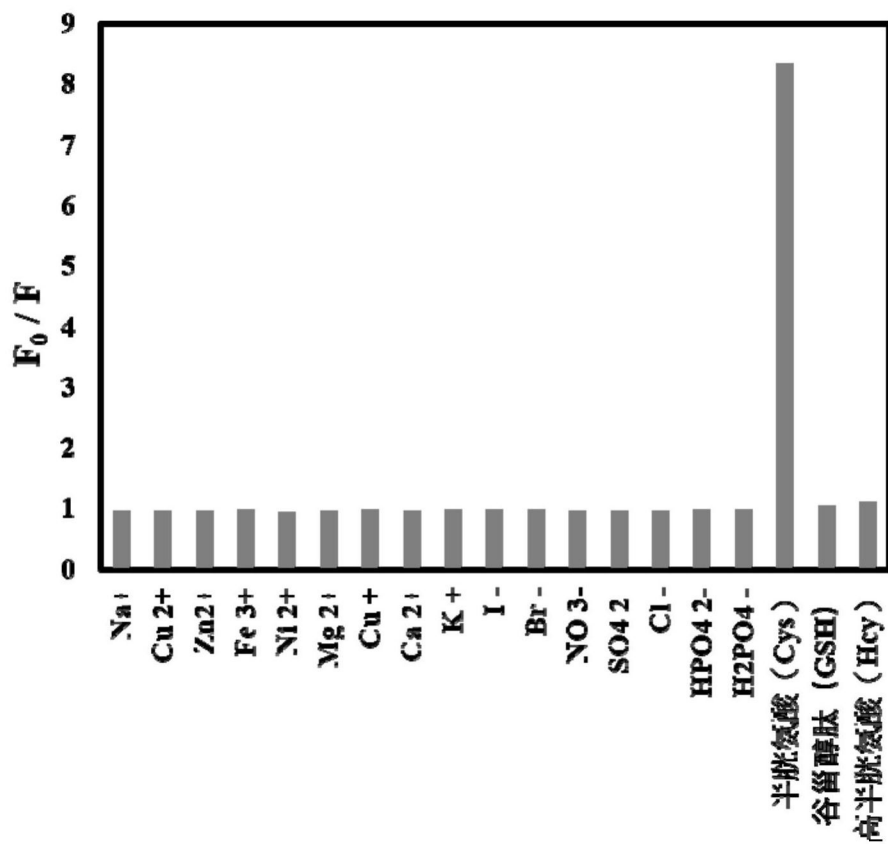


图8

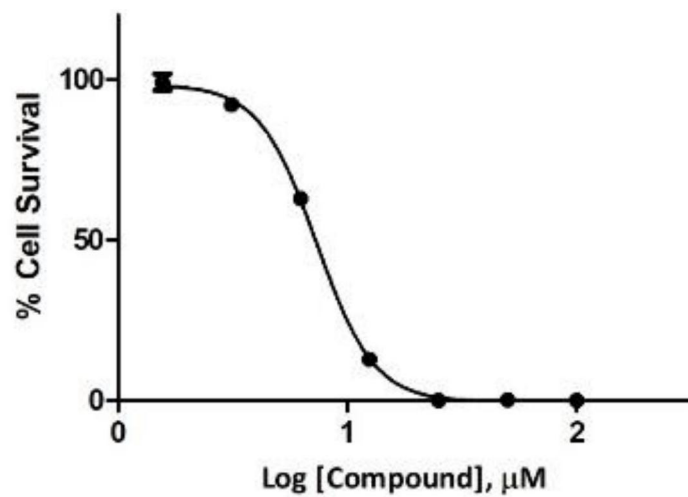


图9

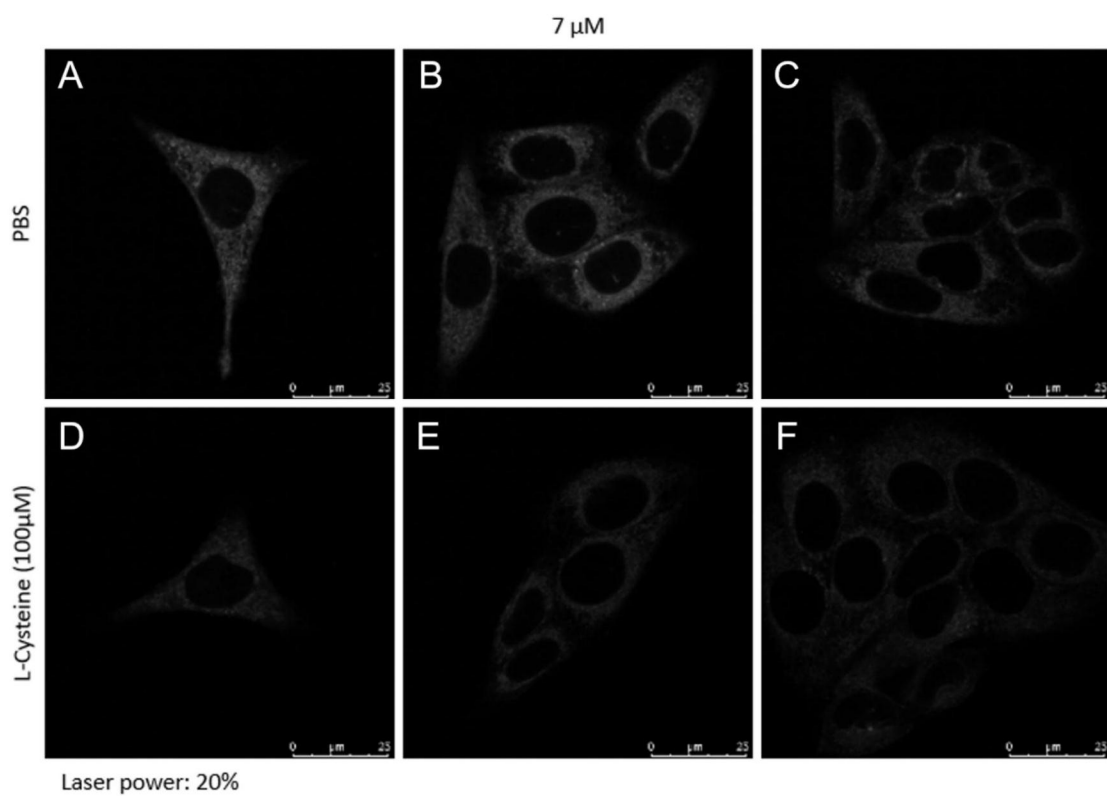


图10

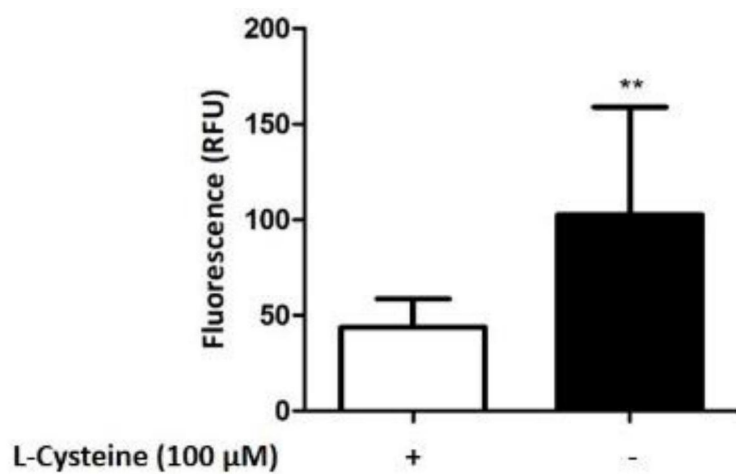


图11