

正交点击反应对应用于标记细胞器

罗宇峰, 梁高林

(中国科学技术大学化学系, 安徽合肥 230026)

摘要:单一点击反应已广泛应用于细胞成像,但是利用多个正交反应对同一生物体系进行多重标记仍然是一个挑战. 本研究将两种不同机理的点击反应——一种是 tetrazine-alkene [4+2] Diels-Alder cycloaddition (四嗪-烯烃 [4+2] 狄尔斯-阿尔德环加成反应), 另外一种 CBT-Cys condensation reaction (2-氟基苯并噻唑-半胱氨酸缩合反应)——结合起来, 验证其正交性, 并将其运用于常见的 HepG2 细胞的细胞器成像中, 实现了同时显示细胞线粒体和细胞膜的状态. 实验结果说明在同一细胞中同时运用两个(或者多个)点击反应标记多个细胞器是可行的.

关键词:点击反应; 正交性; 细胞成像

中图分类号:Q-334 **文献标识码:**A doi:10.3969/j.issn.0253-2778.2016.10.001

引用格式: 罗宇峰, 梁高林. 正交点击反应对应用于标记细胞器[J]. 中国科学技术大学学报, 2016, 46(10): 797-802.

LUO Yufeng, LIANG Gaolin. Labelling cell organelles with dual orthogonal click reaction pairs[J]. Journal of University of Science and Technology of China, 2016, 46(10): 797-802.

Labelling cell organelles with dual orthogonal click reaction pairs

LUO Yufeng, LIANG Gaolin

(Department of Chemistry, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China)

Abstract: While single click reactions for cell imaging are widely applied, employing multiple orthogonal click reactions tracking multiple complex intracellular systems within one cell remains challenging. Our research combined two click reactions with different reaction mechanisms: tetrazine-alkene [4+2] inverse electron demand Diels-Alder cycloaddition, and CBT-Cys condensation reaction. Orthogonality between these two reactions was studied and the two reactions were applied for simultaneous labeling mitochondria and outer cell membrane of HepG2 cells. The results indicate that it is possible to use two (or n) orthogonal click reactions to track multiple organelles within one cell.

Key words: click reaction; orthogonality; cell imaging

0 引言

点击化学是一种高效和高选择性的化学方法,

具有反应易实现、原料易得、在氧气和水环境中稳定等优点^[1]. 其较好的生物相容性更令其在生物体系的研究中得到广泛应用, 如细胞内的分子成像^[2]. 基

收稿日期: 2016-04-20; 修回日期: 2016-07-05

基金项目: 国家自然科学基金联合基金(U1532144)资助.

作者简介: 罗宇峰, 男, 1992年生, 硕士. 研究方向: 分子影像学. E-mail: swlyf@mail.ustc.edu.cn

通讯作者: 梁高林, 博士/教授. E-mail: gliang@ustc.edu.cn

于不同的反应机理,目前较受瞩目的点击反应包括四嗪-烯炔[4+2] D-A 环加成反应^[3-5],它具有极快的反应速率常数。CBT-Cys 缩合反应则是另外一种由极性亲核试剂参与的成环反应^[6],同样具有很快的反应速率和很好的选择性。

点击反应在运用于细胞成像时,首先需要靶向分子与点击反应的分子相连,能够到达需要成像的位置;另外一个点击反应分子与报告基团相连,反应后进行成像。两种分子都需要较好的生物相容性^[7]。在使用单一点击反应已取得研究成果的情况下,生物体系的研究需要同时跟踪一个系统下的多个因子。这就需要多个正交反应同时使用,实现对多个目标的同时标记^[8-9]。

本研究使用基于两种点击反应的 4 种化合物

(4-(1,2,4,5-四嗪-3-基)苯基)甲胺(化合物 1),5-降冰片烯-2-甲酸(化合物 2),Cys(StBu(叔丁基-巯基-半胱氨酸,化合物 3), CBT(2-氰基苯并噻唑,化合物 4),研究了两种不同机理的点击反应的正交性。随后分别将靶向线粒体的分子 TPP-COOH((3-羧丙基)三苯基溴化磷)^[13],靶向细胞表面含巯基蛋白的分子 Mal-NH₂, (N-(2-氨基乙基)马来酰亚胺)^[11]与两种点击反应分子化合物 1、化合物 3,两种不同波长的荧光分子 Rhodamine B(罗丹明 B)、FITC(异硫氰根荧光素)与另外两种点击反应分子化合物 2、化合物 4 相连,将得到的化合物 5、6、7、8 同时运用于细胞成像中,显示了细胞膜和线粒体在同一时间的状态。化合物 1、2、3、4 与 5、6、7、8 的结构式如图 1 所示。

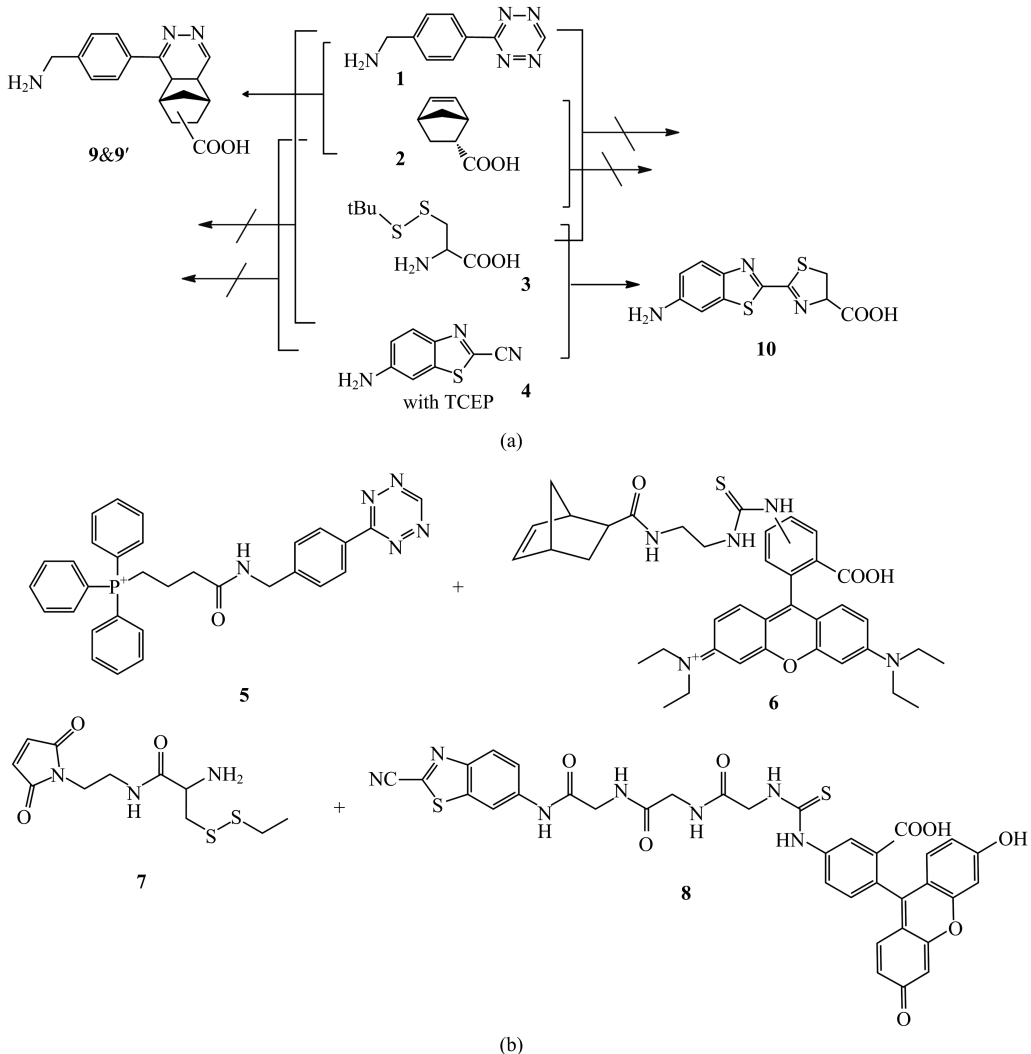


图 1 化合物 1、2、3、4 结构与点击反应正交关系示意图(a)和化合物 5、6、7、8 结构式(b)

Fig. 1 Sketch map of chemical reactivity among compounds tetrazine moieties, norbornene derivatives, Cysteine structures with protected group of -SH and 2-cyanobenzothiazole derivatives(a), and chemical structures of compound 5, 6, 7, 8 (b)

1 实验

1.1 仪器与试剂

实验所用仪器包括 Agilent 1200 高效液相色谱仪 (High Performance Liquid Chromatography, HPLC); Bruker AV III WB-400 MHz 核磁共振波谱仪; Ultrflex II MALDI-TOF/TOF 质谱仪; ThermoFisher Corporation 电喷雾电离质谱 (ESI-MS); Varian Cary 50 UV/Vis 光谱仪; OLMPUS IX71 荧光显微镜。

实验所用试剂购自 Adamas 公司或生工, 均为分析纯及以上; 培养基 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 购自 Thermo Fisher Scientific, 胎牛血清 (FBS) 购自四季青; 青霉素-链霉素溶液 (100X) 购自碧云天 (Beyotime) 生物技术公司。

1.2 化合物的合成

化合物 **1, 3, 7, 8** 的合成参考文献[10-11]。

室温下将 37 mg 化合物 **1** 溶于 1.5 mL DMF (N,N-二甲基甲酰胺) 中, 再加入 86 mg TPP-COOH ((3-羧丙基)三苯基溴化磷), 51 mg HOBt (1-羟基苯并三唑), 135 mg HBTU (O-苯并三氮唑-四甲基脲六氟磷酸盐), 135 μ L DIEA (N,N-二异丙基乙胺), 搅拌反应 6 h, 经 HPLC 纯化后得到化合物 **5**。

将 25 mg 异硫氰根-罗丹明 B 溶于 2 mL DMF 中, 加入 12 mg 乙二胺反应 12 h, 通过 HPLC 纯化主产物; 将主产物溶于 1.5 mL DMF 中, 再加入 55.2 mg 5-降冰片烯-2-甲酸, 54 mg HOBt, 152 mg HBTU, 143 μ L DIEA 反应 6 h, 通过 HPLC 纯化主产物得到化合物 **6**。

合成的化合物的化学结构由高分辨基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱 (HR-MALDI-TOF/MS) 和 ^1H NMR 波谱验证。

1.3 正交性的反应条件、体外反应条件与 HPLC trace

将化合物 **1, 2, 3, 4** 两两配对以 1 mmol/L 的浓度溶于 PBS 缓冲溶液 (pH=7.4, 0.1 mmol/L) 中, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 10 min 后注射到 HPLC 中进行分析。方法为 1%~52% 3 mL 56 min, 检测器波长 214 nm。

将 25 μ mol/L 化合物 **5**, 4 μ mol/L 化合物 **6** 溶于 PBS 缓冲溶液 (pH=7.4, 0.01 mmol/L) 中, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 1 h, 然后注射至 HPLC 中分析, 方法为 20%~80% 3 mL 60 min。检测器波长 550 nm。

100 μ mol/L 化合物 **7**, 15 μ mol/L 化合物 **8** 和 100 μ mol/L TCEP 三(2-羧乙基)膦溶于 0.01 mol/L PBS 37 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 30 min, 用方法为 10%~70% 3 mL 40 min 的 HPLC trace 分析, 检测器波长 450 nm。

1.4 细胞成像实验

人肝癌细胞 HepG2 细胞在含有 10% 牛血清蛋白 (FBS, GIBCO) 和 1% 青霉素-链霉素 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 DMEM (HyClone, Thermo Fisher Scientific, United States) 培养基中培养, 细胞在 5% CO_2 的潮湿空气中以及 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱培养, 培养基每隔一天换一次。

用不含指示剂的培养基分别配制以下浓度的溶液: 化合物 **5** (25 μ mol/L), 化合物 **6** (4 μ mol/L), TCEP (100 μ mol/L), 化合物 **7** (200 μ mol/L), 化合物 **8** (15 μ mol/L)。

在 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 的细胞培养箱中, 用含各个化合物的溶液对执行以下培养步骤: 25 μ mol/L 化合物 **5**, 于培养箱中培养 5 min; 4 μ mol/L 化合物 **6**, 15 min; 100 μ mol/L TCEP, 15 min; 200 μ mol/L 化合物 **7**, 1 h; 15 μ mol/L 化合物 **8**, 15 min。每次更换溶液时吸去上一溶液用 PBS 清洗 3 遍。培养完成后加入 PBS, 置于荧光显微镜下成像。

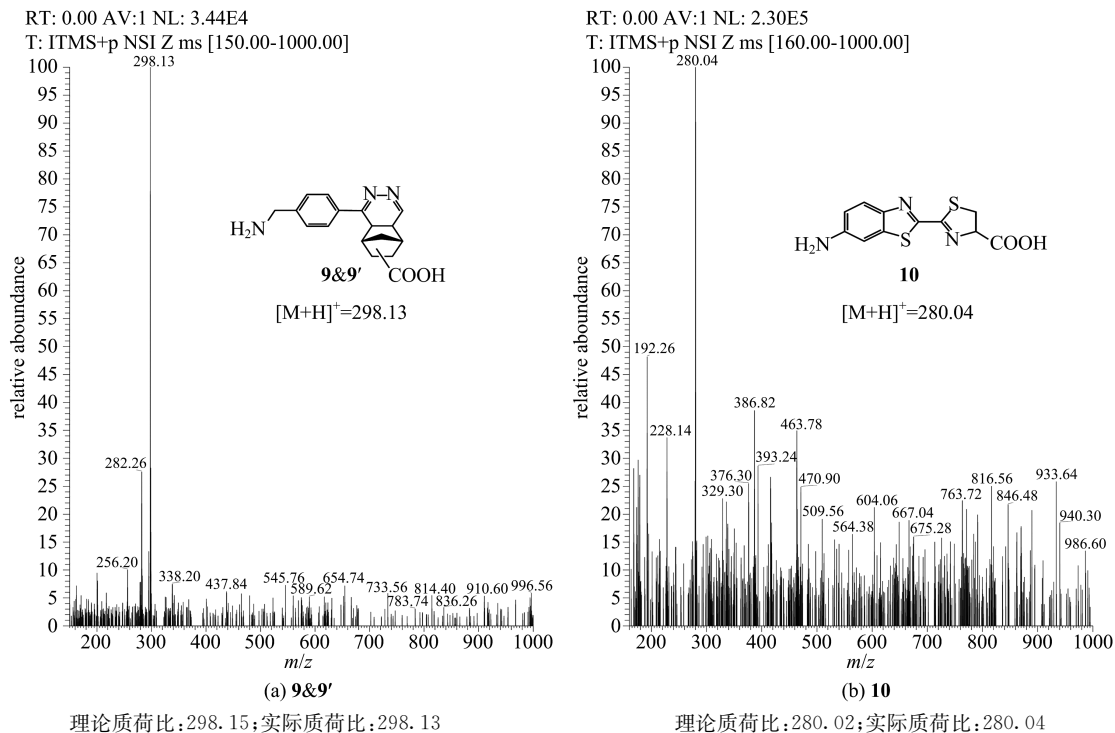
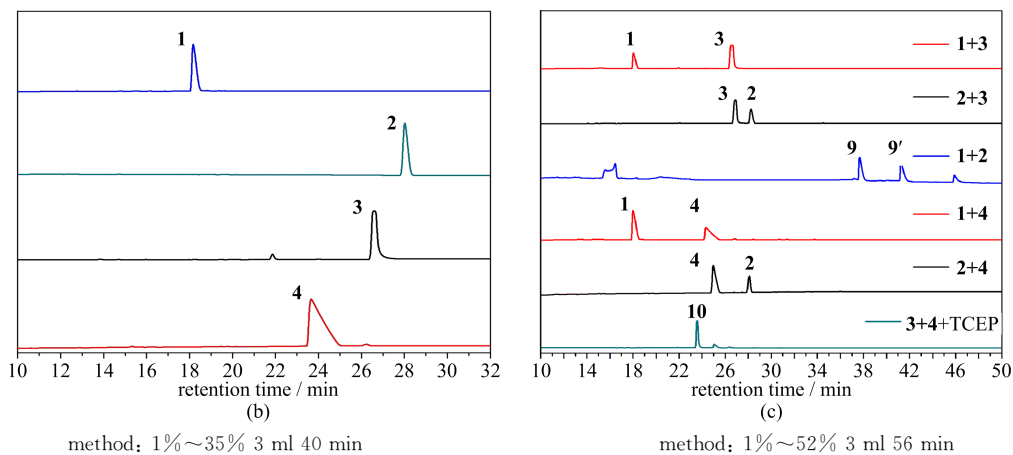
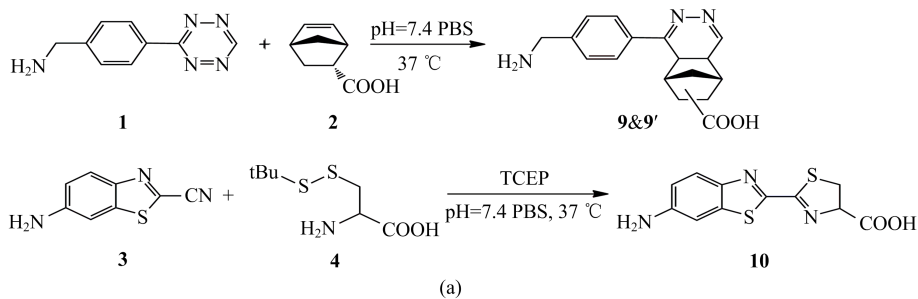
2 结果与讨论

2.1 反应正交性验证

如图 2(b), (c) 所示, 将化合物 **1** 与化合物 **2** 以 1 mmol/L 的浓度溶于 PBS 缓冲溶液 (pH=7.4, 0.1 mmol/L) 中, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 10 min 后注射到 HPLC 中进行分析。HPLC trace 出现了新的化合物 **9&9'**。类似地, 将化合物 **3** 与化合物 **4** 以 1 mmol/L 的浓度溶于 PBS 缓冲溶液 (pH=7.4, 0.1 mmol/L) 中, 在 5 mmol/L TCEP 条件下反应 10 min, 然后注射到 HPLC 中进行分析, 出现了产物峰 **10**。其余两两反应的 HPLC 均未发现有新化合物产生, 说明未发生反应, 由此证明了反应的正交性。产物 **9&9'** 与 **10** 由电喷雾电离质谱 (ESI-MS) 验证。

2.2 荧光探针正交反应验证

如图 3(a), (b) 所示, 化合物 **6** 在加入过量化合物 **5** 反应后保留时间发生了变化。检测器显示峰 **11** 在 300 nm 处有非常特征的紫外吸收, 该吸收峰与化合物 **1** 与 **2** 反应产物相似, 为发生 D-A 环加成反应后行成的二噻环的吸收, 证明化合物 **5** 与 **6** 在该

图 2 反应产物 **9&9'** 和 **10** 的电喷雾电离质谱Fig. 2 ESI-MASS of products **9&9'** and **10**

Wavelength of UV-Vis detector of HPLC is 214 nm

图 3 四嗪-烯炔[4+2] D-A 环加成反应与 CBT-Cys 缩合反应(a)和化合物 **1,2,3,4** 高效液相色谱图(b), 以及两种点击反应正交性验证高效液相色谱图(c)Fig. 3 (a) reaction of two click reactions and their reaction product **9&9'**, **10**, (b) HPLC trace of **1,2,3,4**, (c) HPLC trace of orthogonality study

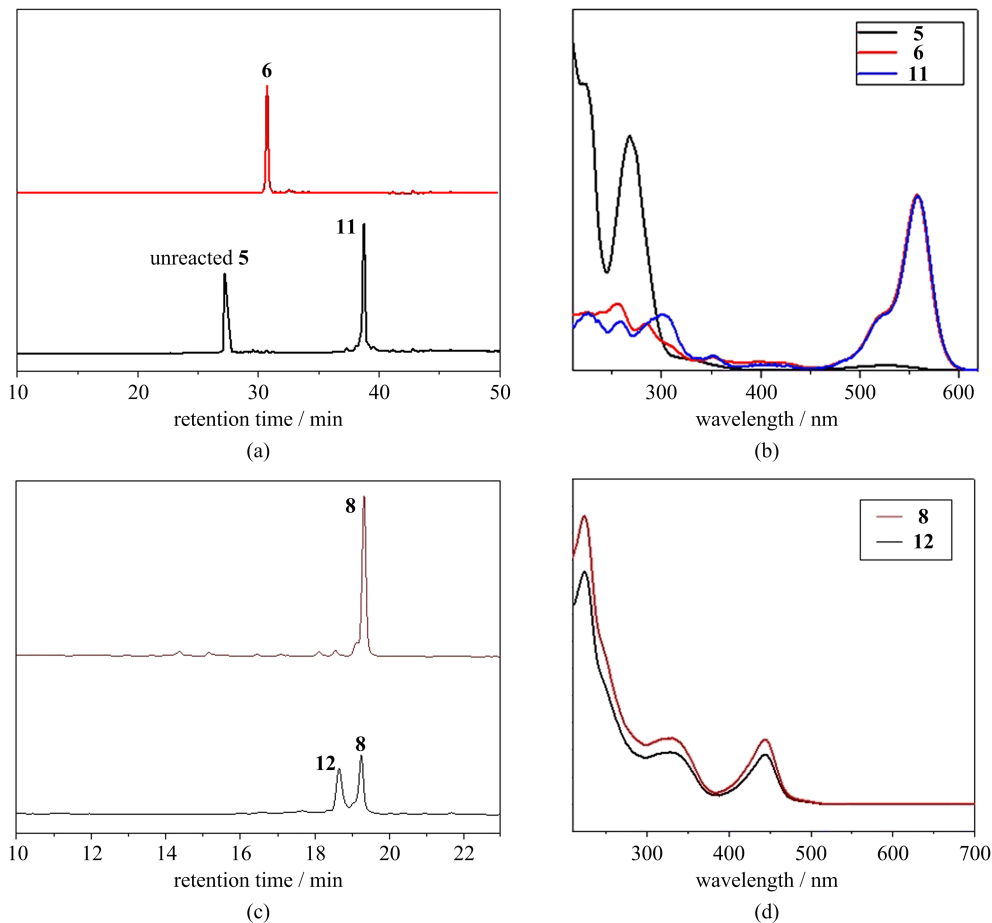


图 4 化合物 6 及其与 5 反应的高效液相色谱图(a), 化合物 5, 6 及其反应产物 11 的紫外吸收(b), 化合物 8 及其与 7 反应的高效液相色谱图(c), 8 和反应产物 12 的紫外吸收(d)

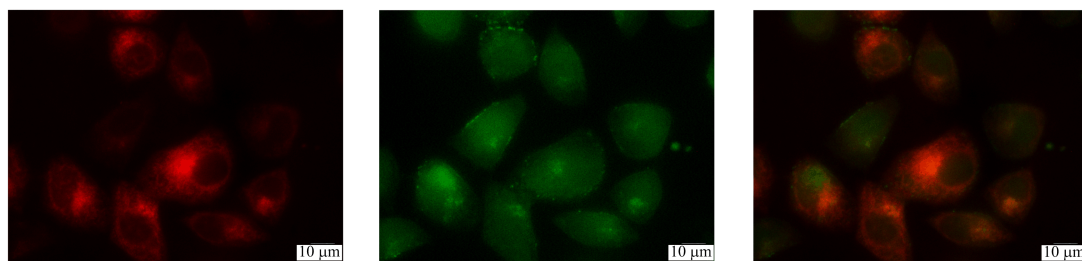
Fig. 4 (a) HPLC traces of 6 and its reaction with 5, (b) UV-Vis absorption spectra of 5, 6 and their reaction product 11, (c) HPLC traces of 8 and its reaction with 7, (d) UV-Vis absorption spectra of 8 and 12

反应条件下可以实现标记的功能。

同样如图 4(c), (d) 所示, 化合物 8 的 HPLC trace 在加入化合物 7 与 TCEP 反应后出现了新的化合物 12 的峰, 证明了反应的发生。

2.3 细胞成像实验

线粒体在红色通道中成像, 细胞膜在绿色通道中成像. 图 5(a) 中显示出了线粒体在细胞中的分布位置以及单个线粒体的颗粒形状. 在图 5(b) 中, 细



(a) 线粒体的红色标记
激发波长: 560~580 nm;
发射波长: 600~650 nm

(b) 对细胞膜表面的巯基进行绿色荧光标记
激发波长: 475~490 nm;
发射波长: 505~535 nm

(c) 图(a)和图(b)的重合图像

标尺: 10 μm

图 5 用正交点击反应对 HepG2 细胞的线粒体和细胞膜进行标记

Fig. 5 Labelling HepG2 cells' mitochondria and membrane by using orthogonal Dual click reactions

胞膜整体呈绿色,而在细胞边缘位置则因为投影厚度的原因呈现更明亮的绿色.二者重叠的图像则显示了细胞膜和线粒体在同一时间的状态.

3 结论

本文通过对化合物 **1,2,3,4** 相互反应的 HPLC 分析,验证了 [4+2] D-A 环加成反应与 CBT-Cys 缩合反应的正交性.利用这样的点击反应,通过连接靶向分子与荧光基团,可以实现在同一个细胞中对线粒体和细胞膜的同时标记.通过体外和细胞内的实验,得到了同时标记线粒体和细胞膜的荧光成像,对细胞状态的呈现快速而准确.由 tetrazine-norbornene[4+2]环加成反应和 CBT-Cys 缩合反应构成的正交反应对可以用于细胞中多个细胞器的同时成像.

参考文献(References)

- [1] PATTERSON D M, NAZAROVA L A, PRESCHER J A. Finding the right (bioorthogonal) chemistry[J]. ACS Chemical Biology, 2014, 9(3): 592-605.
- [2] SONG W, WANG Y, QU J, et al. A photoinducible 1,3-dipolar cycloaddition reaction for rapid, selective modification of tetrazole-containing proteins [J]. Angewandte Chemie International Edition, 2008, 47(15): 2 832-2 835.
- [3] JEWETT J C, SLETTEN E M, BERTOZZI C R. Rapid Cu-free click chemistry with readily synthesized biarylazacyclooctynones[J]. Journal of the American Chemical Society, 2010, 132(11): 3 688-3 690.
- [4] DEVARAJ N K, WEISSLEDER R, HILDERBRAND S A. Tetrazine-based cycloadditions: Application to pretargeted live cell imaging [J]. Bioconjugate Chemistry, 2008, 19(12): 2 297-2 299.
- [5] DEVARAJ N K, WEISSLEDER R. Biomedical applications of tetrazine cycloadditions[J]. Accounts of Chemical Research, 2011, 44(9):816-827.
- [6] LIANG G L, REN H J, RAO J H. A biocompatible condensation reaction for controlled assembly of nanostructures in living cells [J]. Nature Chemistry, 2010, 2(3): 239.
- [7] LIANG Y, MACKEY J L, LOPEZ S A, et al. Control and design of mutual orthogonality in bioorthogonal cycloadditions [J]. Journal of the American Chemical Society, 2012, 134(43): 17 904-17 907.
- [8] KARVER M R, WEISSLEDER R, HILDERBRAND S A. Bioorthogonal reaction pairs enable simultaneous, selective, multi-target imaging [J]. Angewandte Chemie International Edition, 2012, 51(4): 920-922.
- [9] WILLEMS L I, LI N, FLOREA B I, et al. Triple bioorthogonal ligation strategy for simultaneous labeling of multiple enzymatic activities [J]. Angewandte Chemie International Edition, 2012, 51(18): 4 431-4 434.
- [10] YANG J, KARVER M R, LI W L, et al. Metal-catalyzed one-pot synthesis of tetrazines directly from aliphatic nitriles and hydrazine [J]. Angewandte Chemie International Edition, 2012, 51 (21): 5 222- 5225.
- [11] YUAN Y, WANG X J, MEI B, et al. Labeling thiols on proteins, living cells, and tissues with enhanced emission induced by FRET [J]. Scientific Reports, 2013, 3:3 523.
- [12] YUAN Y, LI D, ZHANG J, et al. Bridging cells of three colors with two bio-orthogonal click reactions[J]. Chemical Science, 2015, 6(11): 6 425-6 431.
- [13] CHAKRABORTY A, JANA N R. Design and synthesis of triphenylphosphonium functionalized nanoparticle probe for mitochondria targeting and imaging[J]. Journal of Physical Chemistry C, 2015, 119(5):2 888-2 895.
- [14] KARVER M R, WEISSLEDER R, HILDERBRAND S A. Synthesis and evaluation of a series of 1,2,4,5-tetrazines for bioorthogonal conjugation [J]. Bioconjugate Chemistry, 2011, 22(11): 2 263-2 270.