

自组装纳米荧光探针用于 caspase-3 的检测

韩晓三, 梁高林

(中国科学技术大学化学系, 安徽合肥 230026)

摘要:半胱氨酸蛋白酶-3(caspase-3)是细胞凋亡过程中的主要效应子之一,在多种疾病的检测中扮演重要角色,对其在低浓度下的检测是早期发现肿瘤细胞的有效手段.参考近期发现的 caspase-3 剪切诱导发生的高效缩合反应,设计了化合物 Ac-Asp-Glu-Val-Asp-Cys(StBu)-Lys(FITC)-CBT (1),通过 TCEP(三(2-羧乙基)膦)还原以及在细胞凋亡过程中高表达的 caspase-3 的特异性识别剪切后发生缩合反应,其二聚体产物亲脂亲水性发生变化,可以自组装形成纳米粒子,并由于聚集荧光淬灭效应导致荧光强度较反应前大幅降低,从而实现 caspase-3 的检测.反应生成的纳米粒子通过高效液相色谱、动态光散射仪以及透射电镜等手段进行表征,表明化合物 1 可以在低物质的量浓度下由几个单位的蛋白酶成功剪切缩合并自组装成纳米荧光探针,其荧光强度降低幅度与酶的含量在一定范围内成线性关系,可用于 caspase-3 酶在低浓度下的检测.

关键词: caspase-3; 纳米粒子; 荧光淬灭

中图分类号: O656.31 **文献标识码:** A doi:10.3969/j.issn.0253-2778.2015.08.005

引用格式: Han Xiaosan, Liang Gaolin. Detection of caspase-3 by fluorescence quenching effect of a self-assembly nanoparticle[J]. Journal of University of Science and Technology of China, 2015, 45(8):643-648.
韩晓三, 梁高林. 自组装纳米荧光探针用于 caspase-3 的检测[J]. 中国科学技术大学学报, 2015, 45(8):643-648.

Detection of caspase-3 by fluorescence quenching effect of a self-assembly nanoparticle

HAN Xiaosan, LIANG Gaolin

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

Abstract: Caspase-3 is a very important protease in cell apoptosis and plays a crucial role in many diseases. A new probe Ac-Asp-Glu-Val-Asp-Cys(StBu)-Lys(FITC)-CBT (1) was reported, which can be reduced by TCEP and cleaved by caspase-3 to yield the amphiphilic dimer (1-D). 1-D can quickly self-assemble into nanoparticles to induce a clear fluorescence quenching effect because of the aggregation-caused quench. The nanoparticles were characterized by means of dynamic light scattering (DLS), transmission electron microscope (TEM), and high performance liquid chromatography (HPLC). As a result, the fluorescence intensity has a linear correlation with the concentration of caspase-3, which could be applied to sensing caspase-3 activity in vivo in the future.

Key words: caspase-3; nanoparticle; fluorescence quenching effect

收稿日期:2015-04-20;修回日期:2015-05-23

基金项目:国家自然科学基金(21175122)资助.

作者简介:韩晓三,男,1989年生,硕士.研究方向:分析化学. E-mail: hxs8907@mail.ustc.edu.cn

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

0 引言

半胱氨酸蛋白酶-3 (caspase-3) 在心血管疾病、肿瘤等生理疾病中起着重要作用, 现已证明其活性与肿瘤的生长和转移等过程有着极其密切的关系^[1], 并且在许多疾病如帕金森综合症^[2]、奥斯海默症^[3]等细胞中过表达. Caspase-3 酶在细胞凋亡过程中会选择性切割特异肽链^[4], 是主要的凋亡效应子之一. 因此 caspase-3 的检测为一些肿瘤细胞的早期成像提供了方法. 比较新型的检测手段包括 GO(氧化石墨烯) 探针检测^[5]、TPdye/ β CDP 双光子纳米荧光探针^[6]、¹⁹F 纳米探针^[7] 和 Gd 纳米探针^[8] 的 MRI(核磁共振) 成像检测、FRET(荧光共振能量转移) 荧光探针检测^[9]、MALDI-TOF MS(基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱) 分析^[10] 等.

近年来, 出现了一种新颖的利用小分子自组装对 caspase-3 进行检测的方法^[11]. 自组装是化学、生物界普遍存在的一种小分子聚集成大分子甚至超分子的过程^[12], 比如动植物细胞的细胞膜以及 DNA 的双螺旋结构^[13]. 传统的由酶控制的自组装反应需

要高浓度的反应底物或酶的使用, 才能使小分子在酶的剪切作用下通过 π - π 键、氢键等方式自组装形成超分子. 而近期发现的依靠 CBT(2-氰基-6-氨基苯并噻唑) 的氰基和半胱氨酸的 1,2-氨基硫醇产生的缩合反应^[14-15], 可以通过仅仅几个单位的酶完成剪切, 而缩合产物由于亲脂性发生变化会自组装形成纳米粒子, 从而带来化合物荧光强度等多种化学性质的变化, 这为我们测量低浓度下的 caspase-3 酶的含量提供了有力的工具^[16].

由于 caspase-3 可以识别并剪切特定的氨基酸序列天冬氨酸-谷氨酸-缬氨酸-天冬氨酸(DEV D), 我们设计了化合物 Ac-Asp-Glu-Val-Asp-Cys(StBu)-Lys(FITC)-CBT (**1**), 经 caspase-3 剪切后形成二聚体 **1-D**, 再通过 π - π 堆积自组装形成纳米粒子, 由于聚集荧光淬灭效应^[16], 导致剪切后荧光大幅降低, 从而达到 caspase-3 的检测作用(图 1). 另外我们设计了不包含特定序列的化合物 Ac-Asp-Glu-Lys(FITC)-Val-Cys(StBu)-Asp-CBT (**1-Scr**), 使之不被 caspase-3 剪切, 作为对照组. **1-Scr** 由于不会被 caspase-3 酶特异性剪切而不发生荧光变化, 从而证明荧光淬灭为 caspase-3 的剪切诱导产生.

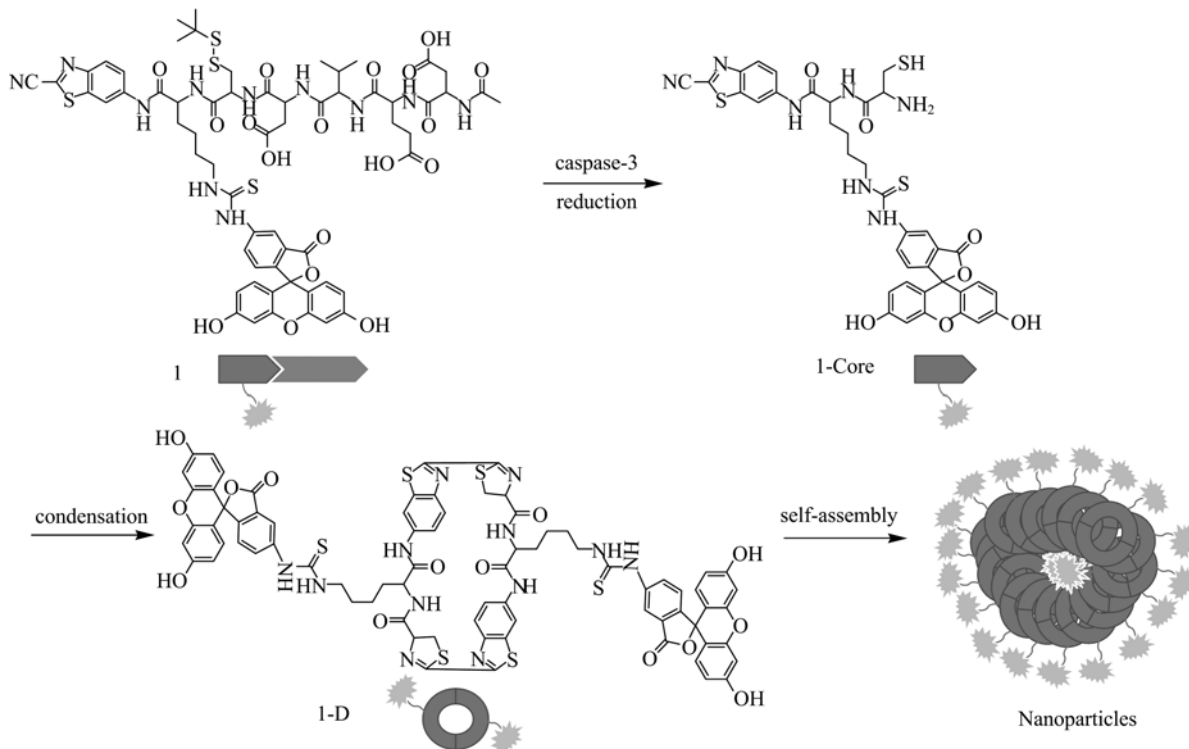


图 1 caspase-3 剪切 DVED 序列后形成纳米粒子过程示意图

由 caspase-3 控制的缩合反应以及自组装生成纳米粒子导致荧光淬灭

Fig. 1 Schematic illustration of reduction and caspase-3-controlled condensation and nanoparticles self-assembly, leading to a fluorescence quenching

1 实验

1.1 仪器与试剂

Agilent 1200 高效液相色谱仪; JEOL 2010 透射电子显微镜(TEM); Hitachi F-2500 荧光光度计; Ultrflex II MALDI-TOF/TOF 质谱仪; ZetaSizerNano 动态光散射仪。

所有实验所用试剂购买自生工及 Adamas, 纯度在分析纯以上, caspase-3 缓冲液(50 mmol/L HEPES, 50 mmol/L NaCl, 10 mmol/L EDTA, 5% glycerol, 1 mmol/L TCEP, pH = 7.4)。Caspase-3 购自 BioVision, 1 个单位的 caspase-3 酶在 37 °C 的缓冲溶液中可以每小时剪切 1 nmol 的标准底物 DEVD-pNA。

1.2 化合物 1 和 1-Scr 的合成

固相合成肽链 Ac-Asp-Glu-Val-Asp-Cys(StBu)-Lys(Boc)后^[18], 经 HPLC(CH₃OH(0.1% TFA), 70%~100%, 40 min)纯化, 取 0.25 mmol 产物于三颈瓶中密封, 通入 N₂ 创造无水无氧环境。将 0.5 mmol MMP(N-甲基吗啉)加入 2 mL 四氢呋喃溶剂中并用注射器打入三颈瓶中, 搅拌至肽链溶解。继续加入含有 0.5 mmol IBCF(异丁基氯甲酸酯)的 2 mL 四氢呋喃溶剂, 置于冰浴中搅拌 30 min。称取 0.25 mmol CBT 溶于 2 mL 四氢呋喃溶剂, 加入并反应 24 h 得到 Ac-ASP-Glu-Val-Asp-

Cys(StBu)-Lys(Boc)-CBT。产物经 HPLC(CH₃CN(0.1% TFA), 70%~100%, 40 min)纯化后加入 20 mL TFA, 1 mL 二氯甲烷, 80 μL TIPS(三异丙基硅烷)溶液, 搅拌 3 h 后得到 Ac-Asp-Glu-Val-Asp-Cys(StBu)-CBT。经 HPLC(CH₃CN(0.1% TFA), 30%~90%, 40 min)纯化后溶于 pH=8~9 的缓冲溶液中, 取 15 mg FITC 试剂溶于 5 mL DMSO(二甲基亚砜)溶液中, 滴加至缓冲液中并反应 2 h, 经 HPLC(CH₃CN(0.1% TFA), 30%~90%, 40 min)纯化后得到终产物 1。1-Scr 的合成方法仅在固相合成中氨基酸顺序有所差别, 其他与化合物 1 步骤相同。

1.3 由 caspase-3 控制的剪切缩合反应

在 caspase-3 的 buffer 溶液中加入 TCEP 和碳酸钠使 pH=7.2, 将化合物 1 溶解于其中并定容至 100 μmol/L, 150 μL。在 37 °C 水浴中与 5 unit/15 μL caspase-3 共培养 3h, 取反应后的混合溶液进行 TEM 表征, 并将反应产物进行 HPLC 分析, 紫外检测波长在 320nm, 即 CBT 中的苯并噻唑对应的吸收波长。将等量的 1-Scr 与 caspase-3 进行与上述相同的反应与表征。

在 37 °C 条件下, 取 5 unit/15 μL caspase-3 与化合物 1 在含 TCEP 的 buffer 溶液中共孵育, 并在 3h 中连续监测溶液的荧光变化(激发波长为 465 nm)。

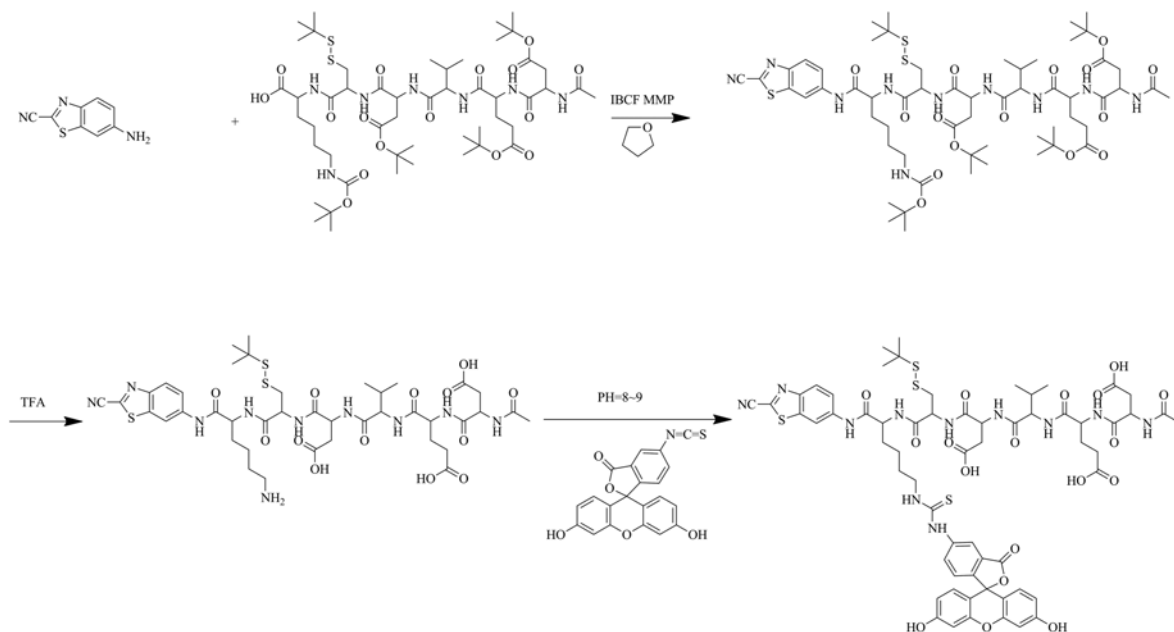


图 2 化合物 1 的合成过程

Fig. 2 Synthetic route for compound 1

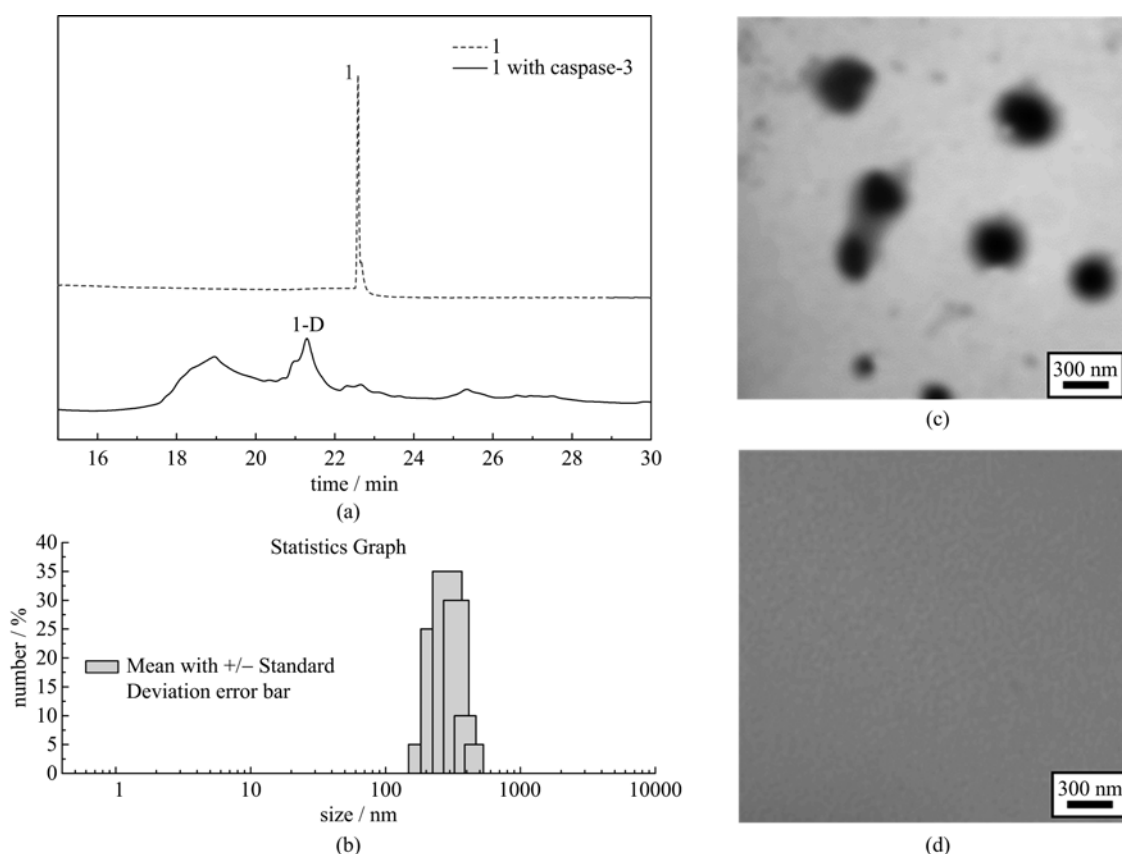


图 3 化合物 1(上方虚线)与化合物 1 缩合反应后(下方实线)在 320 nm 波长下的 HPLC 谱图(a), 化合物 1 与 caspase-3 共孵育 3 h 后形成的纳米粒子动态光散射图(b), 化合物 1 缩合后所形成的纳米粒子 TEM 图(c), 以及化合物 1-Scr 同样处理后的 TEM 图(d)

Fig. 3 (a) HPLC trace of 1 (top, dashed line) and 1 with caspase-3 after incubation at 37 °C for 3 h (bottom, solid line). Absorbance: 320 nm; (b) DLS graph of the incubation mixture of 1 with caspase-3; TEM images of incubation mixtures of 1 (c) or 1-Scr (d) with caspase-3

在 37 °C 条件下, 取不同单位量的 caspase-3 酶与化合物 1 在含 TCEP 的 buffer 溶液中进行共孵育, 并在反应前后分别测量溶液的荧光强度(激发波长为 465 nm)。

2 结果与讨论

2.1 caspase-3 剪切后形成的自组装纳米粒子表征

化合物 1 中的 Asp-Glu-Val-Asp 氨基酸序列在与 caspase-3 共孵育过程中被特异性识别并剪切, buffer 中的 TCEP 可以将化合物中的双硫键还原, 从而产生缩合反应, 并自组装形成纳米粒子。从 HPLC 图谱中我们可以清楚地看到反应前后产生了明显的变化: 原化合物在 17.5 min 处的吸收峰消失, 并产生了新的吸收峰。我们通过基质辅助激光解吸/电离(MALDI)质谱分析表明新吸收峰为缩合产生的二聚体 1-D, 这也证实了我们的实验结果。另

外, TEM 表征可以看到 1-D 因亲水和亲脂性变化而聚集形成的纳米粒子的平均粒径为 250~300 nm, 且粒子均一稳定, 动态光散射(DLS)实验结果也验证了这一点。而对照组 1-Scr 在同等条件下则并没有形成纳米粒子的迹象。

由此可知化合物 1 是被 caspase-3 特异性剪切后, 经 TCEP 还原形成了 1-D, 并自组装形成的纳米粒子。

2.2 自组装纳米荧光探针用于 caspase-3 的检测

由图 4 我们可以看到, 加入 caspase-3 之后的 3 h 之内, 含有化合物 1 的溶液的荧光强度随时间不断减弱。这是由于在形成纳米粒子的过程中, 由于聚集荧光淬灭效应, 大量的 FITC 被包裹在纳米粒子中, 这一效应随着反应继续而越发显著, 直至反应结束达到稳定, 荧光强度降低至反应前的 20%。对照化合物 1-Scr 由于不形成纳米粒子, 荧光强度则不

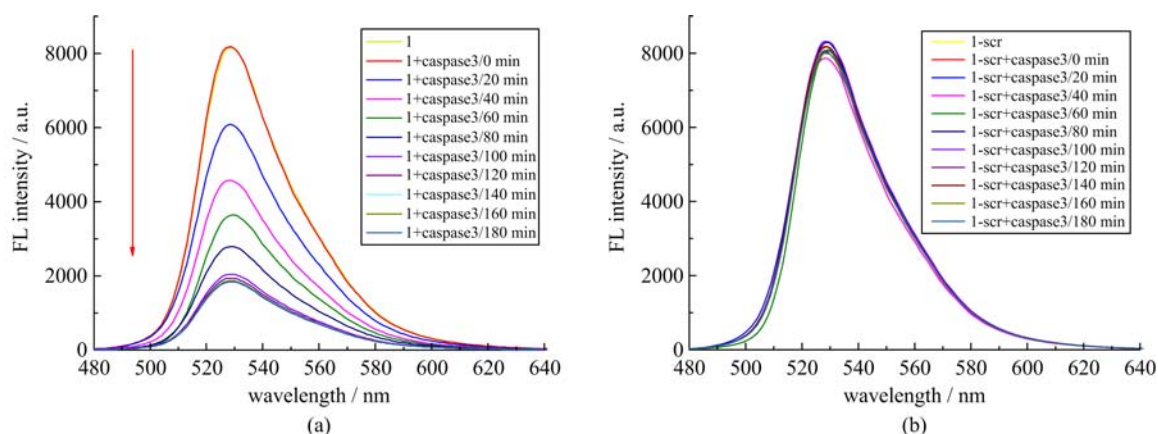


图 4 100 $\mu\text{mol/L}$, 150 μL 化合物 1(a)与化合物 1-Scr(b)在含有 TCEP 的 buffer 溶液中与 5 units/15 μL caspase-3 共同孵育 3 h 过程中溶液荧光强度的变化

Fig. 4 Fluorescence spectra of 100 $\mu\text{mol/L}$, 150 μL 1 (a) or 1-Scr (b) incubated with 5 units/15 μL caspase-3 in buffer for 3 h

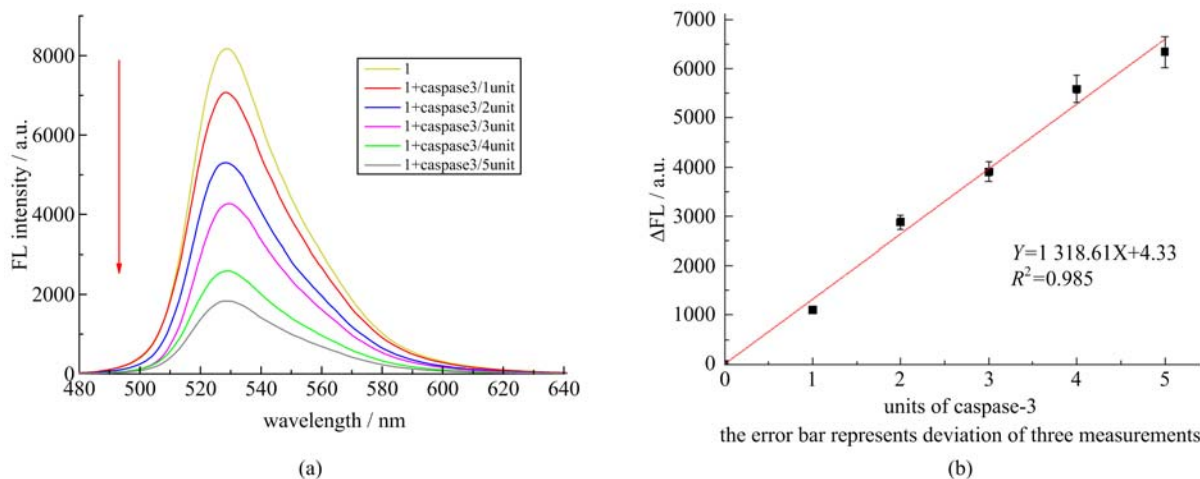


图 5 化合物 1 与不同单位量的 caspase-3 酶在含有 TCEP 的 buffer 溶液中共同孵育 3h 后的荧光光谱图(a), 及其荧光变化量与 caspase-3 单位量的线性拟合图(b)

Fig. 5 (a) Fluorescencespectra of 1 with different units of caspase-3 incubated in buffer with TCEP at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 3 h; (b) Correlation of ΔFL in panel (a) with different caspase-3 concentrations

发生明显变化。

由此我们设计了多组不同含量的 caspase-3 进行平行试验. 结果表明 3 h 内化合物 1 在不同单位量的 caspase-3 下的荧光强度下降程度呈现大致线性关系(图 5), 这证实了我们设计的荧光纳米探针的应用价值和灵敏度, 可以在低浓度下有效地检测出 caspase-3 的含量。

3 结论

通过化合物 1 及 1-Scr 在酶切反应过程中的荧光强度变化分析, 可以证明我们设计的荧光探针被 caspase-3 酶特异性识别剪切后发生缩合反应, 并通

过自组装形成了纳米粒子, 由于聚集荧光淬灭效应导致荧光强度显著降低. 此方法可以用于灵敏地检测低浓度下 caspase-3 的含量. 进一步的, 该方法有望发展应用于检测活体细胞中 caspase-3 酶的含量并以此监控癌细胞的形成过程, 为癌症的早期检测提供有效方案。

参考文献 (References)

- [1] Cohen G. Caspases: The executioners of apoptosis[J]. Biochemical Journal, 1997, 326: 1-16.
- [2] Blandini F, Sinforiani E, Pacchetti C, et al. Peripheral proteasome and caspase activity in Parkinson disease and Alzheimer disease[J]. Neurology, 2006, 66(4):

- 529-534.
- [3] Engidawork E, Gulesserian T, Yoo B C, et al. Alteration of caspases and apoptosis-related proteins in brains of patients with Alzheimer's disease [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2001, 281(1): 84-93.
- [4] Thornberry N A, Rano T A, Peterson E P, et al. A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B Functional relationships established for key mediators of apoptosis [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272(29): 17 907-17 911.
- [5] Wang H, Zhang Q, Chu X, et al. Graphene oxide-peptide conjugate as an intracellular protease sensor for caspase - 3 activation imaging in live cells [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2011, 50(31): 7 065-7 069.
- [6] Yan H, He L, Zhao W, et al. Poly β -Cyclodextrin/TPdye nanomicelle-based two-photon nanoprobe for caspase-3 activation imaging in live cells and tissues [J]. *Analytical Chemistry*, 2014, 86 (22): 11 440-11 450.
- [7] Yuan Y, Sun H, Ge S, et al. Controlled intracellular self-assembly and disassembly of ^{19}F nanoparticles for MR imaging of caspase 3/7 in zebrafish [J]. *ACS Nano*, 2015, 9(1): 761-768.
- [8] Ye D, Shuhendler A J, Pandit P, et al. Caspase-responsive smart gadolinium-based contrast agent for magnetic resonance imaging of drug-induced apoptosis [J]. *Chemical Science*, 2014, 5(10): 3 845-3 852.
- [9] Vickers C J, González-Paárez G E, Wolan D W. Discovery of a highly selective caspase-3 substrate for imaging live cells [J]. *ACS Chemical Biology*, 2014, 9(10): 2 199-2 203.
- [10] Hu J, Liu F, Ju H. Peptide code-on-a-microplate for protease activity analysis via MALDI-TOF mass spectrometric quantitation [J]. *Analytical Chemistry*, 2015, 87 (8): 4 409-4 414.
- [11] Ye D, Shuhendler A J, Cui L, et al. Bioorthogonal cyclization-mediated in situ self-assembly of small-molecule probes for imaging caspase activity in vivo [J]. *Nature Chemistry*, 2014, 6(6): 519-526.
- [12] Liu L, Xu K, Wang H, et al. Self-assembled cationic peptide nanoparticles as an efficient antimicrobial agent [J]. *Nature Nanotechnology*, 2009, 4(7): 457-463.
- [13] Adler-Abramovich L, Aronov D, Beker P, et al. Self-assembled arrays of peptide nanotubes by vapour deposition [J]. *Nature Nanotechnology*, 2009, 4(12): 849-854.
- [14] Yang Z, Liang G, Xu B. Enzymatic hydrogelation of small molecules [J]. *Accounts of Chemical Research*, 2008, 41(2): 315-326.
- [15] Liang G, Ren H, Rao J. A biocompatible condensation reaction for controlled assembly of nanostructures in living cells [J]. *Nature Chemistry*, 2010, 2(1): 54-60.
- [16] Liang G, Ronald J, Chen Y, et al. Controlled self - assembling of gadolinium nanoparticles as smart molecular magnetic resonance imaging contrast agents [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2011, 50(28): 6 283-6 286.
- [17] Yuan W Z, Lu P, Chen S, et al. Changing the behavior of chromophores from aggregation - caused quenching to aggregation - induced emission: Development of highly efficient light emitters in the solid state [J]. *Advanced Materials*, 2010, 22(19): 2 159-2 163.
- [18] Cao C Y, Shen Y Y, Wang J D, et al. Controlled intracellular self-assembly of gadolinium nanoparticles as smart molecular MR contrast agents [J]. *Scientific Reports*, 2013, 3:1024; doi: 10.1038/srep01024.