

Sci. Adv.: 空间位阻诱导的扭曲分子内电荷转移策略实现荧光的“开-关”

近日，庆应义塾大学 Kenjiro Hanaoka 和东京大学 Yasuteru Urano 等人合作，在基于空间位阻诱导的扭曲分子内电荷转移的荧光探针的设计与应用方面取得新进展，相关研究成果以“A general fluorescence off/on strategy for fluorogenic probes: Steric repulsion-induced twisted intramolecular charge transfer (sr-TICT)”为题发表在 *Sci. Adv.*上。基于时间相关密度泛函 (TD-DFT) 的理论计算数据，本文采用空间位阻诱导的扭曲分子内电荷转移 (sr-TICT) 机制设计合成了一系列具有荧光“开-关”性质的罗丹明染料。作者将所制备的具有 CYP3A4 活性的探针 2-Me PeER 用于荧光激活细胞分类 (fluorescence-activated cell sorting, FACS) 技术当中。该研究为 sr-TICT 型荧光探针的设计提供了通用的策略。文章链接 DOI: 10.1126/sciadv.adi8847。

正文

荧光探针的优点在于其高灵敏度、高选择性和非侵入性，因而可以实现快速、准确地检测。大多数具有荧光“开-关”性质的分子设计是基于光诱导电子转移 (PeT)、Förster 共振能量转移 (FRET) 和分子内螺旋环化，尚不能满足荧光探针的应用需求。罗丹明是一种具有明亮发射、高光学稳定性和水溶性的染料，作者研究了 N-烷基化罗丹明染料的 sr-TICT 过程以探明荧光“开-关”的响应机制。在罗丹明的 TICT 过程中，在光激发后电荷转移主要发生在氨基 (电子给体) 到氧杂蒽骨架 (电子受体) 之间，同时伴随着氧杂蒽骨架与 N 原子间 ($C_{\text{aryl}}-N$) 单键的扭转 (Fig. 1A 和 B)。尽管 N-烷基化罗丹明染料由于 TICT 过程的存在而荧光淬灭，但是该染料的种类较少且 $C_{\text{aryl}}-N$ 键易受限制。因此，N-烷基化罗丹明染料的发光亮度适中。下载化学加 APP 到你手机，收获更多商业合作机会。本文中，作者首先利用理论计算数据分析了罗丹明染料中的 TICT 过程，进而设计合成了一系列改进的罗丹明染料。通过结构修饰引入分子内扭转基团，加速了染料分子的 TICT 过程从而使荧光被淬灭。最后，作者制备了具有 CYP3A4 活性的荧光探针并通过荧光激活细胞分类技术得到了均匀的、高功能性的人类诱导的多能干细胞衍生的肝细胞和肠上皮细胞。如 Fig. 1C 和 D 所示，激发态的罗丹明染料在 $j = 50^\circ \sim 60^\circ$ 时具有旋转势垒。Azetidiny-罗丹明染料的旋转势垒要比四甲基罗丹明 (TMR) 要高，因此前者的 TICT 态相比于 LE 态更不稳定。以上结果表明 Azetidiny-罗丹明染料中较高的势垒和 TICT 态的不稳定性抑制了 TICT 过程，从而使染料的亮度增强。基于理论计算数据，作者通过增强 TICT 的途径发展了非荧光罗丹明染料。作者认为降低 LE 态到 TICT 态的旋转势垒同时稳定 TICT 态可以加速 TICT 态的形成。因此，假设在罗丹明染料中的二烷基胺基的邻位引入“体积大”的基团可以使分子的空间位阻增大，打破分子的平面性，加速 TICT 态的形成 (Fig. 1E)。为了验证该策略的有效性，作者设计了探针 2-Me TMR 并计算了 $C_{\text{aryl}}-N$ 键的旋转角度对总能量的依赖关系 (Fig. 1F)。

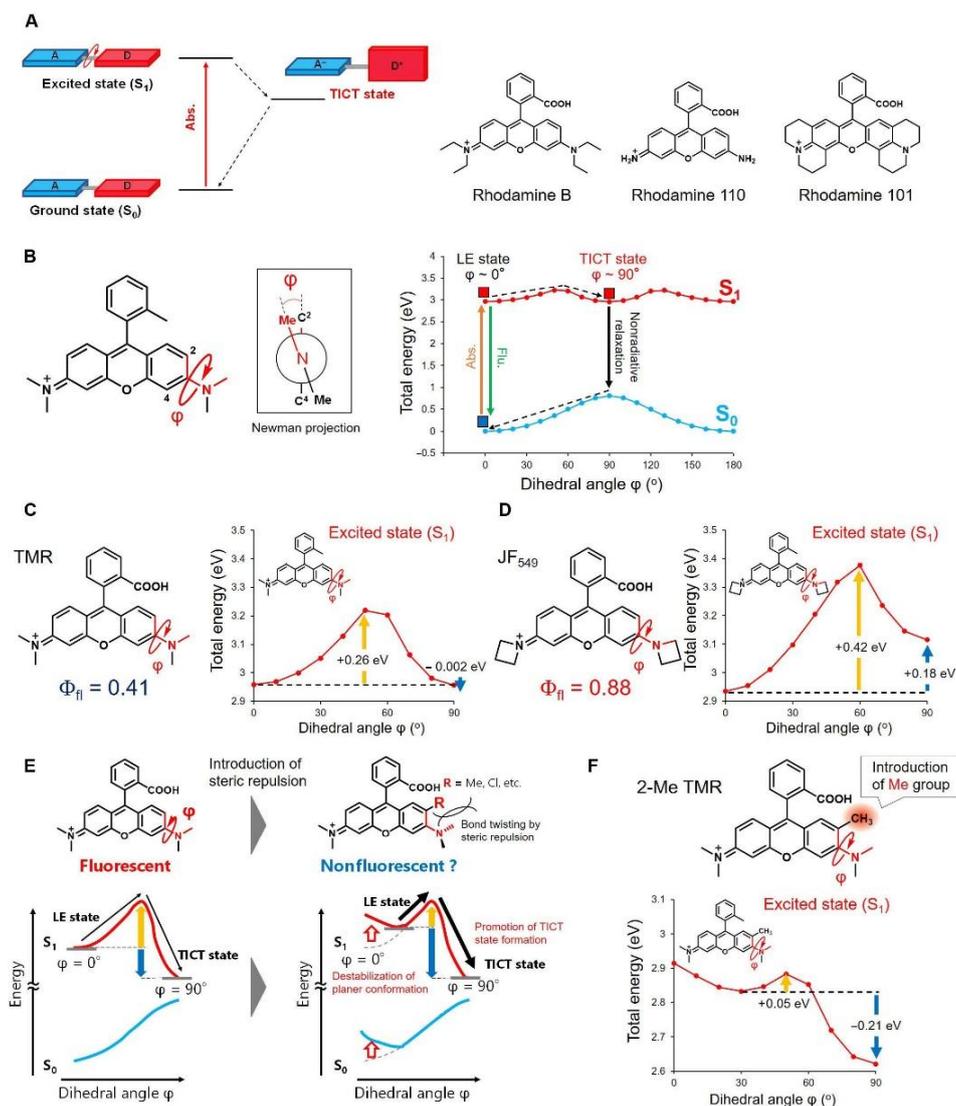


Figure 1. 罗丹明染料 TICT 过程的理论计算和基于 TICT 机制的罗丹明非荧光染料的分

子设计

(图片来源: *Sci. Adv.*) 接下来, 作者设计合成了 2-Me TMR 染料并分析其光学稳定性。尽管 2-Me TMR 与 TMR 染料的吸收光谱相似 (Fig. 2A 和 B), 但是前者的荧光量子产率显著降低。如 Fig. 2C 所示, 随着溶液体系粘度的增加, 分子的荧光量子产率也随之增加。此外, 由于溶剂的极性会影响分子的 TICT 过程, 2-Me TMR 在低极性溶剂中具有更高的荧光量子产率。以上结果表明由于空间位阻基团的引入, 染料 2-Me TMR 表现出 TICT 特征。为了验证位阻基团的“尺寸”对 TICT 过程的影响, 作者合成了含 F 和 Cl 原子的罗丹明染料衍生物。由于 F 原子的“尺寸”较小, sr-TICT 过程的发生相对较容易, 从而展现出较高的荧光量子产率 (Fig. 2D 和 E)。同时, 2-F TMR 和 2-Cl TMR 染料的旋转势垒要比 TMR 小, TICT 态相比于 LE 态也更加稳定 (Fig. 2F)。

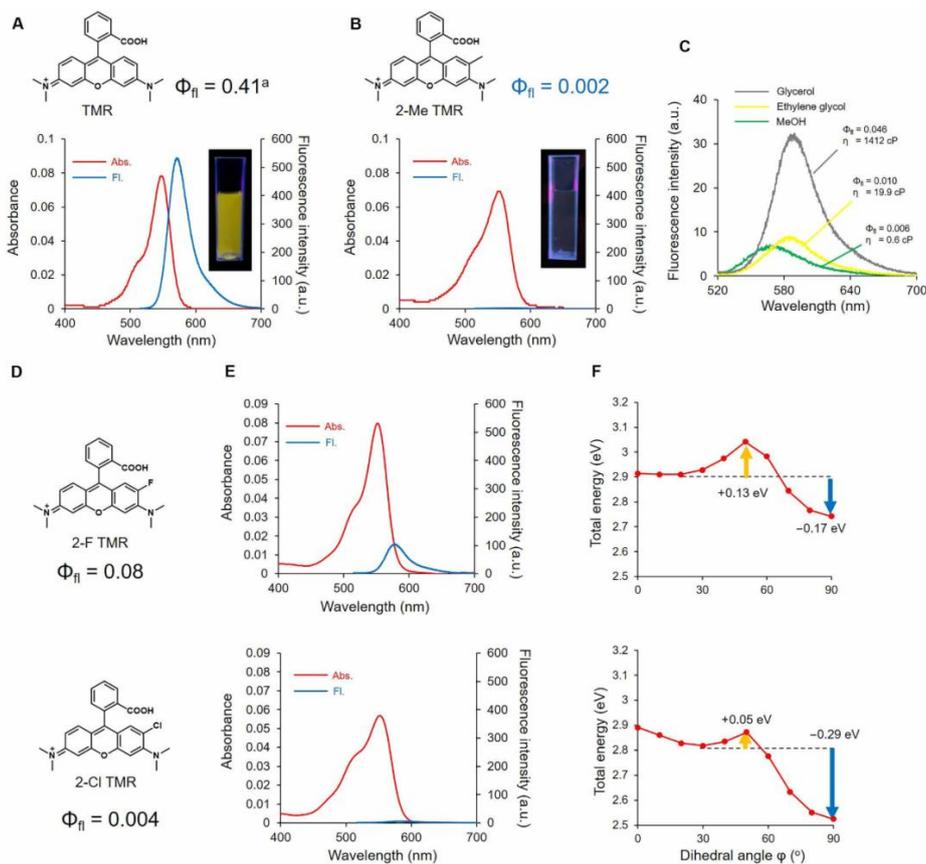


Figure 2. 基于 sr-TICT 机制的罗丹明非荧光染料的分子设计

(图片来源: *Sci. Adv.*)

为了研究杂蒽骨架上氨基取代基对 sr-TICT 过程的影响, 作者合成了 2-Me TMR 和 2-Cl TMR (Fig. 3A 和 B)。N-去甲基衍生物的荧光量子产率相比于未取代染料的荧光量子产率要高。以上结果表明 sr-TICT 的荧光淬灭效率可以通过调控氨基取代基实现。理论计算和荧光量子产率-旋转势垒数据均证明罗丹明染料的 TICT 态与旋转势能 E_a 和 LE 态的 ΔH 有关 (Fig. 3C 和 D)。

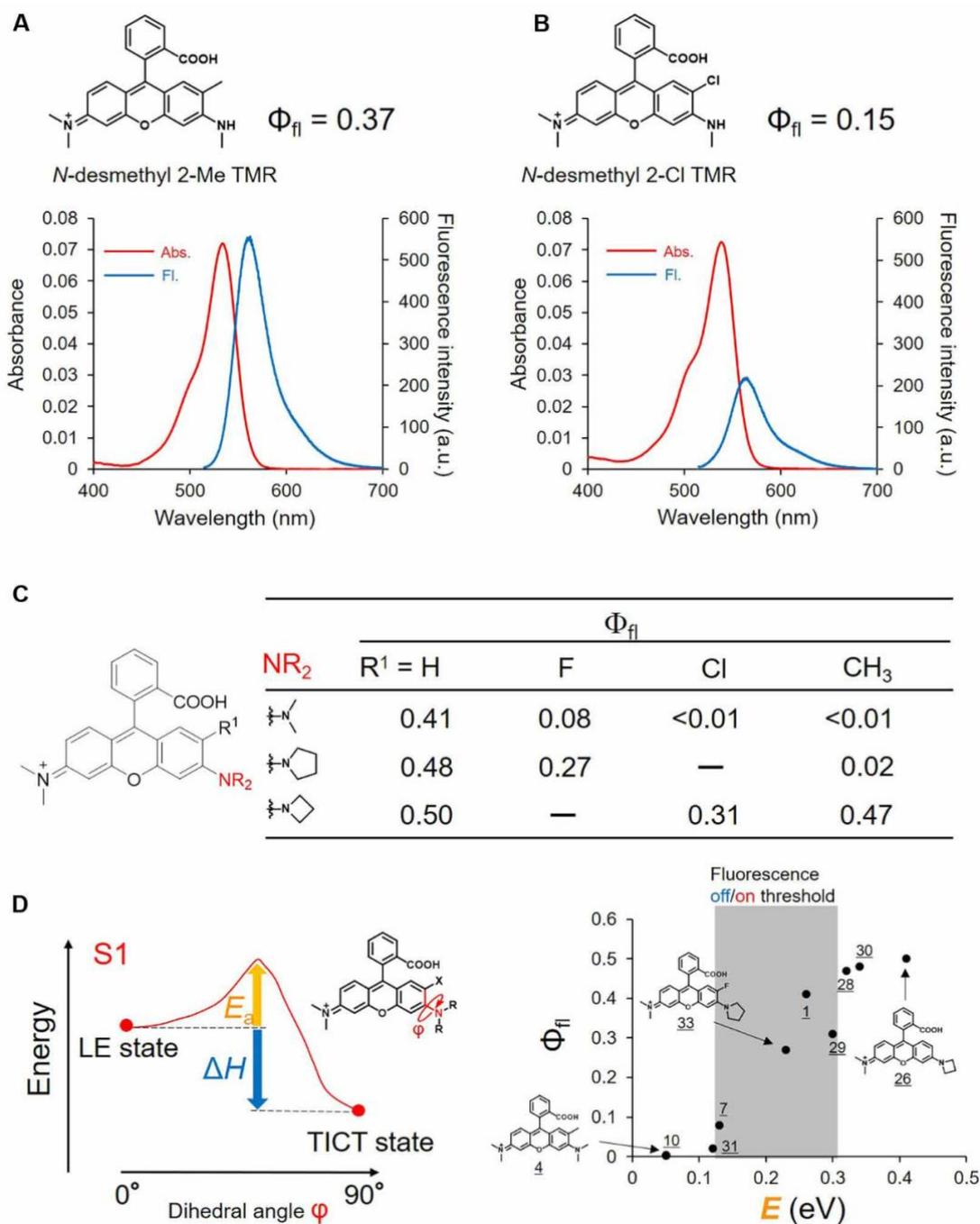


Figure 3. 氨基取代基对 sr-TICT 过程的影响以及基于 sr-TICT 机制的罗丹明染料的

TD-DFT 计算

(图片来源: *Sci. Adv.*) 作者利用染料对细胞色素 P450 3A4 (CYP3A4) 的 N-脱烷基化过程得到了具有荧光“开-关”性质的探针 (Fig. 4A)。在加入 CYP3A4 后, 2-Me HER 显示出特异性的荧光增强现象 (Fig. 4B)。此外, 作者发现增加烷基的链长还能够提升染料对 CYP3A4 的反应活性。最后, 2-Me PeER 在 PBS 缓冲液中的低蛋白含量条件下对 CYP3A4 具有很高的反应活性和较低的荧光量子产率 (Fig. 4C 和 D)。同时, 2-Me PeER 对 CYP3A4 也表现出明显的荧光增

强性质和高选择性 (Fig. 4E)。此外, 2-Me PeER 还展示出对人肝微粒体 (HLM) 的荧光增强特征 (Fig. 4F)。

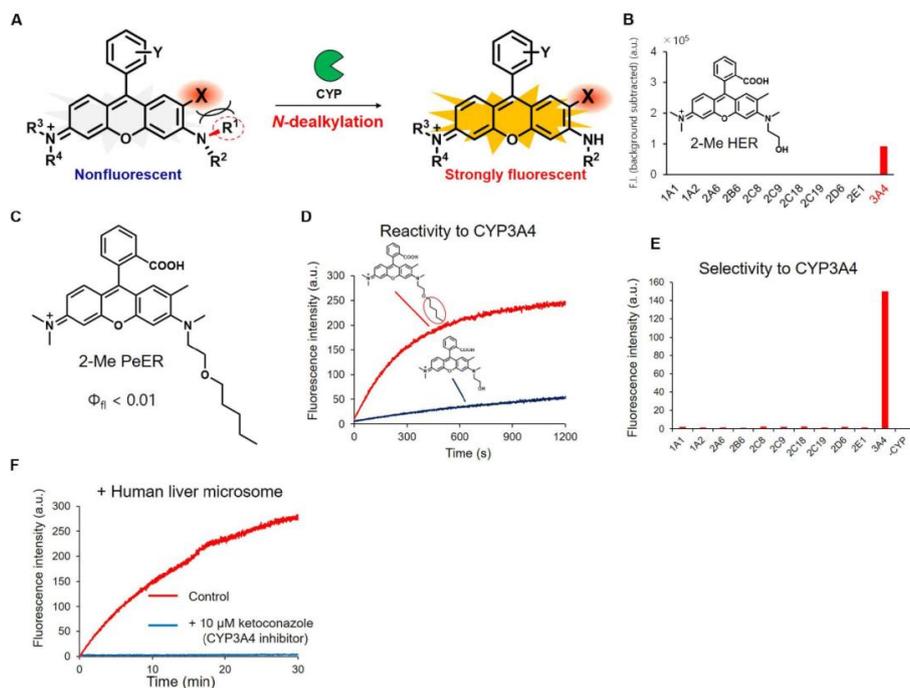


Figure 4. CYP3A4 和 2-Me PeER 活性荧光探针的设计及体外实验

(图片来源: *Sci. Adv.*)

在细胞实验中, 2-Me PeER 在活细胞中可以对 CYP3A4 进行荧光成像 (Fig. 5A-C)。同时, 2-Me PeER 还能够对 HepaRG 细胞进行明亮的荧光成像 (Fig. 5D 和 F)。2-Me PeER 主要被类肝细胞代谢并保留在细胞内, 该性质有利于使 2-Me PeER 能够在复杂的培养条件下评价细胞的 CYP3A4 的活性, 有望被用于荧光激活细胞分类术中。

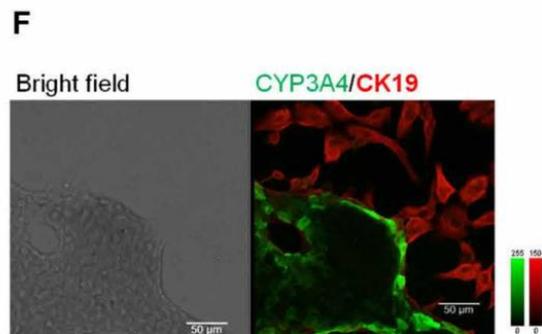
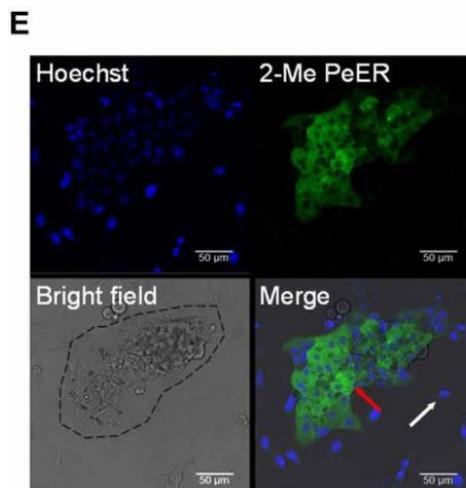
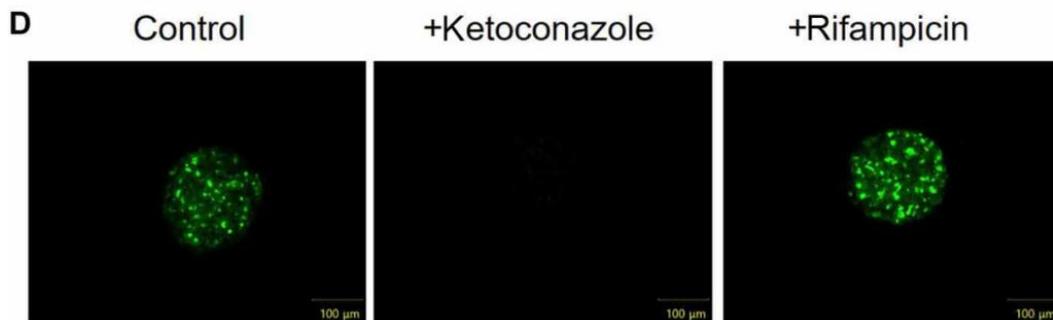
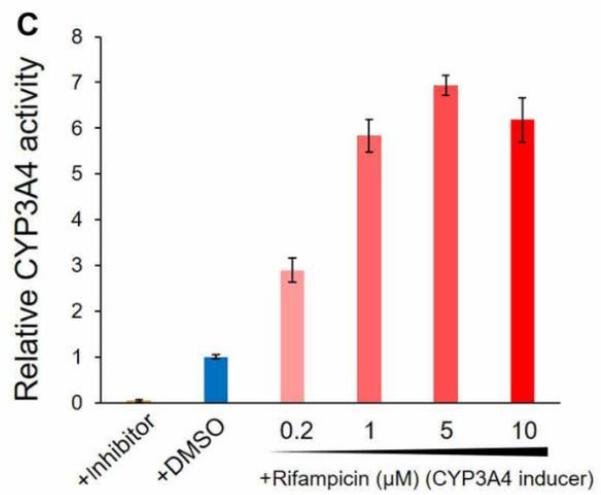
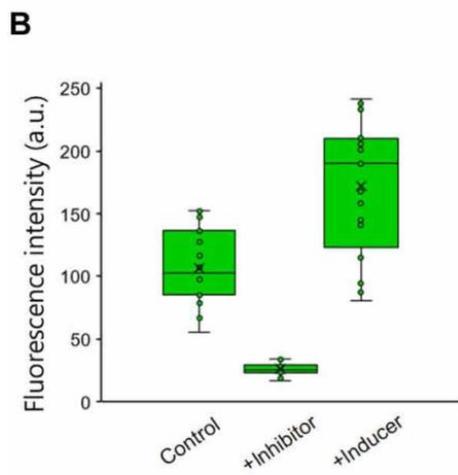
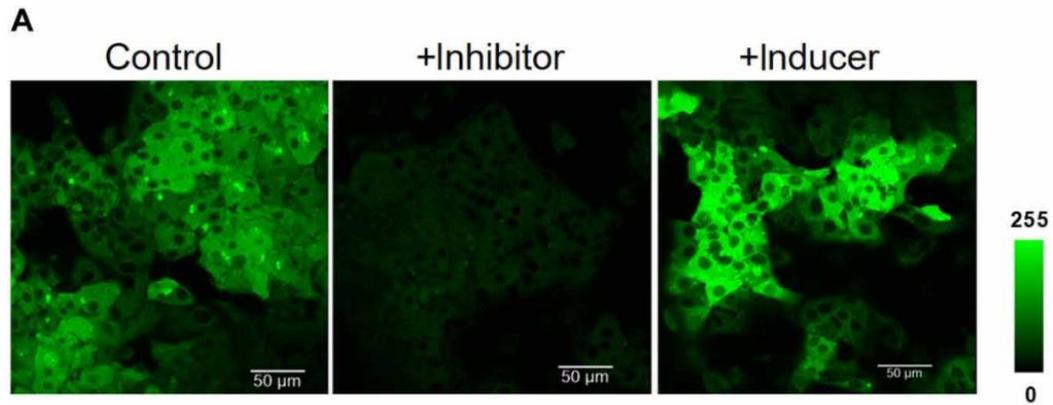


Figure 5. 2-Me PeER 活性荧光探针的活细胞成像

(图片来源: *Sci. Adv.*) 最后, 利用荧光激活细胞分类技术, 作者还成功验证了 2-Me PeER 可对多能干细胞来源的肝样细胞和肠道上皮细胞进行分类筛选 (Fig. 6)。

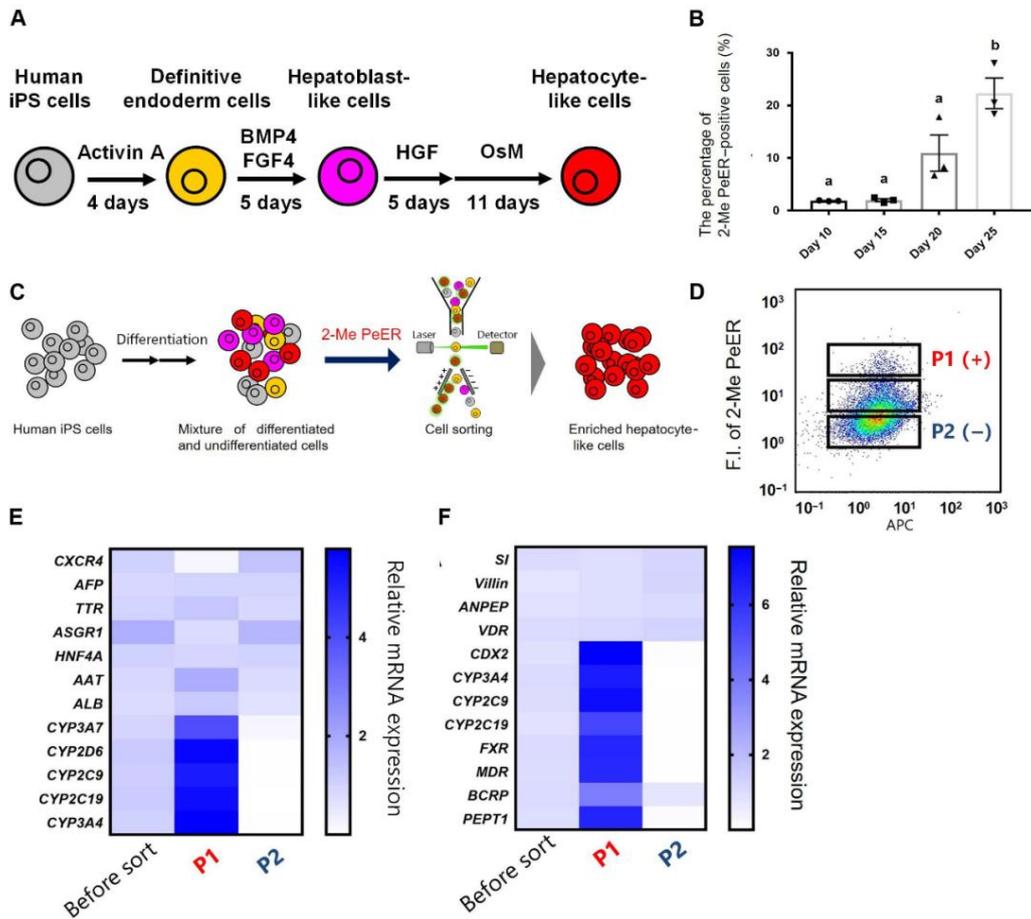


Figure 6. 2-Me PeER 活性荧光探针的细胞实验

(图片来源: *Sci. Adv.*)

总结

庆应义塾大学 Kenjiro Hanaoka 和东京大学 Yasuteru Urano 等人通过理论计算数据分析了罗丹明染料中的 TICT 过程, 从而利用空间位阻策略加速了 TICT 过程, 实现了对荧光强度的调控。为了验证策略的有效性, 作者验证了 2-Me PeER 探针在体外实验中可以高灵敏度地检测 CYP3A4, 表现出在药物筛选方面的巨大应用潜力。

文献详情:

Kenjiro Hanaoka*, Takayuki Ikeno, Shimpei Iwaki, Sayaka Deguchi, Kazuo Takayama, Hiroyuki Mizuguchi, Fumiya Tao, Nobuhiko Kojima, Hisashi Ohno,

Eita Sasaki, Toru Komatsu, Tasuku Ueno, Kazuya Maeda, Hiroyuki Kusuhara, Yasuteru Urano*. A general fluorescence off/on strategy for fluorogenic probes: Steric repulsion-induced twisted intramolecular charge transfer (sr-TICT). *Sci. Adv.* 2024, <https://doi.org/10.1126/sciadv.adi8847>