中国科学: 化学 2017 年 第 47 卷 第 8 期: 1007 ~ 1014
SCIENTIA SINICA Chimica chemcn.scichina.com
《中国科学》杂志社 SCIENCE CHINA PRESS
论 文 分子荧光探针专刊

蛋氨酸亚砜还原酶荧光探针的设计及应用

张良伟[1], 刘瑞娟[1], 康洁[1], 孙金玉[1], 侯亚男[1], 喻红[2], 房建国[1*]

1. 兰州大学功能有机分子化学国家重点实验室, 兰州大学化学化工学院, 兰州 730000
2. 武汉大学医学部基础医学院生物化学与分子生物学系, 武汉 430071
*通讯作者, E-mail: fangjg@lzu.edu.cn

收稿日期: 2017-03-20; 接受日期: 2017-05-19; 网络版发表日期: 2017-07-18
国家自然科学基金(编号: 21402077, 21572093)、甘肃省自然科学基金(编号: 145RJZA225)和中央高校基本科研业务费专项基金(编号: lzujbky-2014-178, lzujbky-2016-49)资助项目

摘要 蛋氨酸亚砜还原酶(Msr)是一类很好的抗氧化酶和蛋白修复酶, 在生物体氧化还原体系中扮演着重要的角色. 本文依据其反应特异性及分子探针发光机制, 设计合成了可用于检测蛋氨酸亚砜还原酶活性的探针Msr-TFMCM, 并详细研究了其与Msrs的相互作用及反应机理. 在此基础上, 将Msr-TFMCM进一步用于活细胞内Msrs活性的可视化检测. 在培养的细胞中预先加入Msrs的底物蛋氨酸亚砜可以显著抑制荧光信号, 说明了探针可以实现对Msrs的专一性检测.

关键词 蛋氨酸亚砜还原酶, 荧光探针, 三氟甲基香豆素, 活细胞成像

1 引言

蛋氨酸亚砜还原酶(又称甲硫氨酸亚砜还原酶, methionine sulfoxide reductase, Msr)是一类很好的抗氧化酶和蛋白修复酶, 广泛存在于从细菌到人类的大多数原核、真核生物中. 到现在为止, 蛋氨酸亚砜还原酶家族中至少发现6种亚型Msrs[1,2,3]. 其中, 研究最多的是蛋氨酸亚砜还原酶A (Msr A)和蛋氨酸亚砜还原酶B (Msr B). Msr A能够特异性地将游离或与蛋白相连的*S*-型蛋氨酸亚砜(MetO)催化还原为蛋氨酸(Met)[4]. Msr B可以特异性地催化还原蛋白质中的*R*-型MetO残基, 也可低效率地还原游离的*R*-型MetO[5]. 但是, 蛋氨酸亚砜还原酶活性的检测手段方面的研究相对缺乏, 已报道的检测蛋氨酸亚砜还原酶活性的方法主要有3种: 液闪计数仪法[6]、高效液相色谱检测(HPLC)[7,8]和液质联用法(LC-MS)[9]. 现有的检测方法, 需要破坏细胞再进行化学方法检测, 存在步骤复杂、繁琐等缺点, 而细胞结构的破坏会导致氧化还原环境以及各种氧化还原相关酶类的重新分布, 很难真实地反映该酶的活性. 近期, 陈建国课题组[10]报道了一种利用比色法快速检测蛋氨酸亚砜还原酶活性的方法, 即利用5,5′-二硫双(2-硝基苯甲酸) (DTNB)检测反应过程中消耗的二硫苏糖醇(DTT)来间接反映酶的活性(DTNB→TNB, 无色→黄色). 该方法有一定改进, 降低了检测成本. 但此种比色法灵敏度较低, 而且只能用于细胞外的活性检测. 因而发展新的蛋氨酸亚砜还原酶活性检测方法, 特别是能够在活细胞内应用的新手段, 对研究这类酶在生理过程中的作用是非常有意义的.

荧光成像技术因具有简单、易于操作、灵敏度高、选择性高、非破坏性等优点, 而取得了快速发展,

引用格式: 张良伟, 刘瑞娟, 康洁, 孙金玉, 侯亚男, 喻红, 房建国. 蛋氨酸亚砜还原酶荧光探针的设计及应用. 中国科学: 化学, 2017, 47: 1007–1014
Zhang L, Liu R, Kang J, Sun J, Hou Y, Yu H, Fang J. A novel fluorescent probe for methionine sulfoxide reductases. *Sci Sin Chim*, 2017, 47: 1007–1014, doi: 10.1360/N032017-00053

© 2017 《中国科学》杂志社

且在化学、生物、医学各领域发挥着重要作用. 现在已有大量的化学小分子探针直接应用于细胞内各种物质的实时检测, 如酶、活性氧、活性氮、活性硫、活性氯、金属离子、阴离子等[11~29]. 近期, 有两例关于利用荧光探针检测蛋氨酸亚砜还原酶活性的报道. 探针的设计基于Msrs催化还原的底物不再仅局限于蛋氨酸亚砜及其蛋白结合物, 某些具有甲基亚砜结构的小分子也可以被Msrs还原为相应的甲基硫醚, 如二甲基亚砜(DMSO)、舒林酸等[30,31]. Mišek课题组[32]报道比值探针(*S*)-Sulfox-1检测蛋氨酸亚砜还原酶活性, 并应用于大肠杆菌内蛋氨酸亚砜还原酶活性的成像研究. 本课题组建立了含有甲基亚砜结构的小分子库(23个), 从中筛选出了高度选择性的蛋氨酸亚砜还原酶活性的探针Msr-blue, 并实现了在哺乳动物活细胞内可视化实时检测Msrs活性. 基于此探针, 我们进一步揭示了该酶功能散失与帕金森症之间的内在联系[33]. 目前, 关于Msrs活性的探针还非常少, 仍然需要发展新的探针来促进认知其在生理过程中的作用. 在此, 基于三氟甲基香豆素荧光团, 我们报道了一例新的Msrs探针Msr-TFMCM, 相比于Msr-blue, Msr-TFMCM具有较大的发射波长, 因而可能在生物应用中具有更多的优势.

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

瓦里安300 MHz液体超导核磁共振波谱仪(美国); 布鲁克400 MHz液体超导核磁共振波谱仪(德国); 安捷伦荧光分光光度计(Agilent Cary Eclipse, 美国); 安捷伦高效液相色谱仪(Agilent 1100); TRACE DSQ气质联用仪(Thermo, 美国); Esquire 6000离子阱质谱仪(Bruker, 德国); 电子天平(十万分之一) (Mettler-Toledo, 瑞士); pH计(梅特勒-托利多); CO_2细胞培养箱(Thermo, 美国); SZ-97自动三重纯水蒸馏器(上海亚荣生化仪器厂, 中国); Floid荧光显微镜(life Technologies, 美国). 重组大肠杆菌的Msr A依据文献制备[34]; 其余药品、试剂均为市售分析纯.

2.2 探针Msr-TFMCM的合成

2.2.1 化合物2的合成

化合物**1**根据本实验室先前报道的方法制备[35]. 将化合物**1** (123 mg, 0.5 mmol)溶于20 mL丙酮中, 加入无水碳酸钾(345 mg, 2.5 mmol). 室温搅拌下, 逐渐滴加碘甲烷(200 μL). 薄层色谱(TCL)检测, 反应结束, 抽滤, 旋干, 柱层析, 得到产品化合物**2**. 核磁共振氢谱(^{1}H NMR) (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.57 (d, *J*=8.0 Hz, 1H), 7.17 (d, *J*=8.6 Hz, 2H), 6.68 (s, 1H), 2.54 (s, 3H). 核磁共振碳谱(^{13}C NMR) (75 MHz, $CDCl_3$) δ 158.83, 154.74, 147.20, 124.93, 123.27, 122.29, 113.93, 113.85, 112.61, 109.95, 14.71. ESI-MS (*m*/*z*, %): 260 (M^+, 100), 232 (61), 217 (53).

2.2.2 Msr-TFMCM的合成

将化合物**2** (104 mg, 0.4 mmol)溶于20 mL二氯甲烷中, 置于冰浴中. 30 min后, 分批加入间氯过氧苯甲酸(*m*-CPBA) (68 mg, 0.4 mmol). TCL监测反应进程. 反应结束, 旋干, 柱层析. 得到白色固体, 产率为74%. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.89 (dd, *J*=8.4, 1.7 Hz, 1H), 7.72 (d, *J*=1.6 Hz, 1H), 7.60 (dd, *J*=8.4, 1.6 Hz, 1H), 6.89 (s, 1H). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 157.74, 154.44, 151.95, 141.29, 140.96, 140.63, 140.30, 126.46, 126.43, 122.52, 119.57, 117.54, 117.49, 117.43, 115.30, 113.03, 43.75. ESI-MS (*m*/*z*, %): 276 (M^+, 93), 261 (100), 44 (47).

2.3 测试条件

2.3.1 荧光测试

将探针、二硫苏糖醇(DTT)、蛋氨酸亚砜还原酶或裂解液加入于1 mL微量荧光比色皿中, 于37℃下孵育, 测试荧光.

2.3.2 细胞培养及细胞成像

293T细胞用培养液(10%牛血清、2 mM谷氨酰胺、100 units/mL的青霉素、100 mg/mL的链霉素)种植到灭菌后6孔板中, 于37℃, 5% CO_2培养箱中继续培养过夜. 加入探针孵育4 h, 磷酸盐缓冲溶液(PBS)洗涤, 在Floid荧光显微镜蓝色通道进行观察, 拍照. 对于MetO的抑制试验, 先加入MetO (5 mM), 并孵育30 min, 然后再加入探针作用4 h.

2.3.3 高效液相色谱

液相色谱分析采用Agilent ZORBAX SB-C18柱(5 μm, 4.6×150 mm)在Agilent 1100高效液相色谱仪上进行, 流速为0.6 mL/min, 流动相为甲醇:水 (6:4).

2.3.4 测定探针的V_{max}与K_m值

固定DTT (5 mM)和Msr A (120 nM)的浓度, 改变



图 1　探针Msr-TFMCM的合成

探针浓度(0~10 μM), 测定在不同探针浓度下底物被还原的速度, 再通过双倒数作图, 获得V_{max}与K_m值.

3　结果与讨论

3.1　Msr-TFMCM的设计与合成

探针的设计基于两点: (1) 蛋氨酸亚砜还原酶可以催化还原含有甲基亚砜的小分子化合物; (2) 分子探针的发光机制, 即分子内电荷转移(ICT)机制, 电子给体与受体之间一般是以π键共轭体系相连, 构成典型的D-π-A型分子, 是一个强的推-拉电子体系. 设想可以合成含有甲基亚砜及其他吸电子基团的荧光分子. 当甲基亚砜被Msrs还原成甲硫基后, 由拉电子基团变为供电子基团, 基于ICT机理, 则有可能会出现荧光信号的变化. 香豆素是一个典型的可以用于ICT发光机理的荧光基团, 我们以巯基香豆素为原料, 经烷基化、氧化两步得到目标分子Msr-TFMCM (图1).

3.2　Msr-TFMCM对Msr A的荧光响应

在细胞内, 蛋氨酸亚砜还原酶催化还原蛋氨酸亚砜是依赖硫氧还蛋白体系完成的, 在体外, 可以用DTT替代硫氧还蛋白体系完成还原反应的循环. 在本课题组[33]先前的研究中, 发现DTT的用量有可能会与甲基亚砜化合物发生作用. 首先, 研究了DTT的用量对探针Msr-TFMCM的影响. 如图2所示, 在TE缓冲溶液(50 mM Tris-HCl、1 mM EDTA, pH 7.4)中, 考察了Msr-TFMCM对不同浓度DTT以及DTT/Msr A作用12 h的荧光变化. 由图2可以看出, 不同浓度DTT对探针Msr-TFMCM的荧光信号没有影响, DTT/Msr A则能够引起荧光增强, 约为51倍. 继而, 考察了探针Msr-TFMCM随时间的荧光变化. 在缓冲溶液中, 只有探针(10 μM)时, 荧光是非常微弱的. 加入DTT/Msr A (5 mM/200 nM)后, 置于37℃环境, 间隔特定时间测定荧光. 由图3所示, 随时间的增加, 荧光强度逐渐增强, 6 h时大约增强39倍. 由此可以看出, 在DTT存在下Msr A可以催化还原探针Msr-TFMCM, 用于检测其活性. 同时, 在固定酶和DTT的浓度条件下, 改变探针的

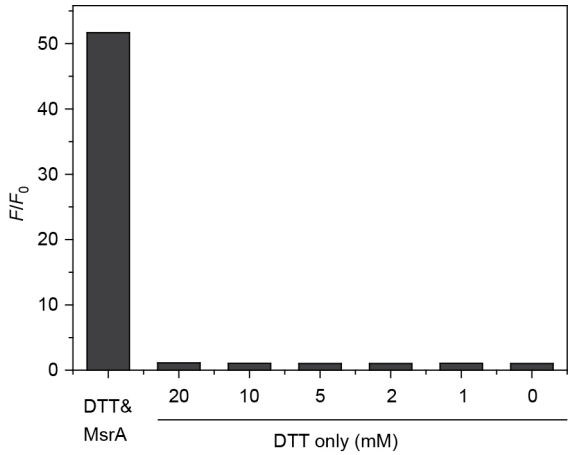


图 2　在TE缓冲溶液(50 mM Tris-HCl、1 mM EDTA, pH 7.4)中, 探针Msr-TFMCM (10 μM)对不同浓度DTT以及DTT/Msr A (5 mM/200 nM)作用12 h的荧光变化(λ_{ex}=350 nm, λ_{em}=495 nm) (网络版彩图)

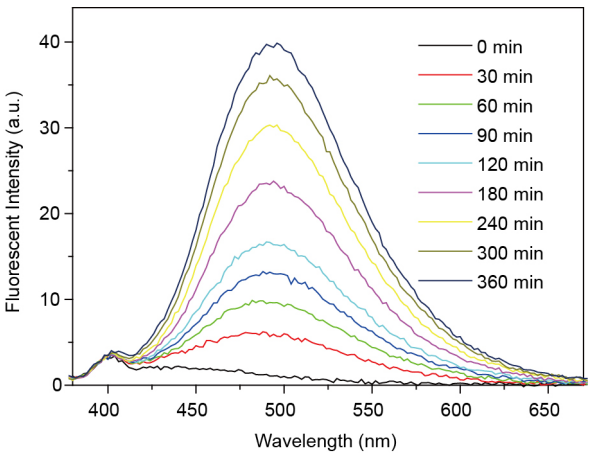


图 3　在TE缓冲溶液(50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.4)中, DTT (5 mM)存在下Msr A (200 nM)催化还原探针Msr-TFMCM (10 μM), 荧光强度随时间的变化曲线(λ_{ex}=350 nm) (网络版彩图)

浓度, 测定该探针在Msr A催化下的V_{max}和K_m值分别为3.78×10^{-5} μM/s和3.94 μM. 相比于Msr-blue[33], 虽然Msr-TFMCM荧光增加倍数较低, 但具有更高的亲和力(较小的K_m值)和更长的发射波长(向长波长移动了57 nm), 因而可能会有利于其在生物体系中的应用.

为了详细研究探针Msr-TFMCM与DTT/Msr A的作用, 我们进一步研究了探针Msr-TFMCM对Msr A的浓度依赖关系. 将一定浓度的Msr-TFMCM (10 μM)、DTT (5 mM)和不同浓度Msr A置于比色皿中, 于37℃的水浴锅中孵育, 隔一定的时间测定在495 nm处的荧光强度, 得到如图4所示的曲线. 在只有探针与DTT的情况下, 探针的荧光强度随时间几乎没有变化. 探针Msr-TFMCM与一定浓度的Msr A作用, 荧光强度会随着时间增长不断增强, 并且酶的浓度越大, 荧光响应越强, 显示出很好的计量依赖关系.

3.3 反应机理

通过以上实验说明, 探针Msr-TFMCM可以与Msr A在DTT存在下发生作用, 引起明显的荧光变化, 其作用机制可能与我们提出设计原理一致. 认为其荧光强度的增强是由于Msr A将探针Msr-TFMCM的甲基亚砜基团催化还原成为甲硫基, 由原来拉电子基团变为供电子基团, 从而加强了分子内电荷转移, 表现为荧光增强. 我们通过高效液相色谱进一步证明了这一反应机理. 如图5所示, 分别以探针Msr-TFMCM和化合物**1**为标准化合物, 得到图5(a) (320 nm下检测)和图5(b) (350 nm下检测). 探针Msr-TFMCM与Msr A/DTT作用6 h后的混合物分时间段用不同波长检测信号(图5(c)), 可以看出, 产生的化合物和标准化合物**1**的峰位置是一致的, 说明推测的机理是正确的. 并通过(b), (c)峰面积的计算, 生成相应的硫醚化合物1的量约为12%, 通过(a), (c)峰面积的计算, 得出剩余Msr-TFMCM的量约为83%, 说明了探针在酶的催化下几乎没有其他产物生成, 但转化率较低, 还有待于进一步提高.

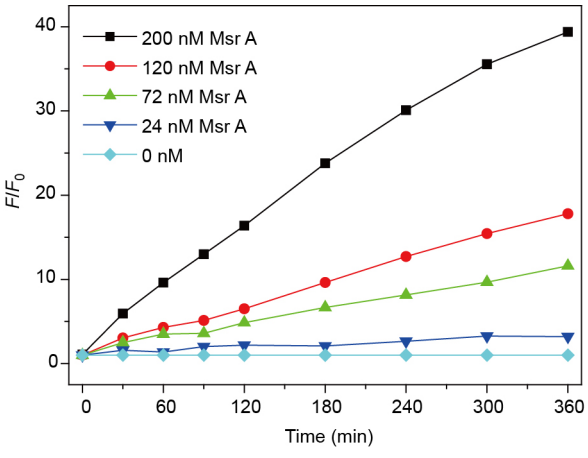


图 4 探针Msr-TFMCM(10 μM)与不同浓度下的Msr A在495 nm处荧光强度比值随时间的变化(λ_{ex}=350 nm) (网络版彩图)

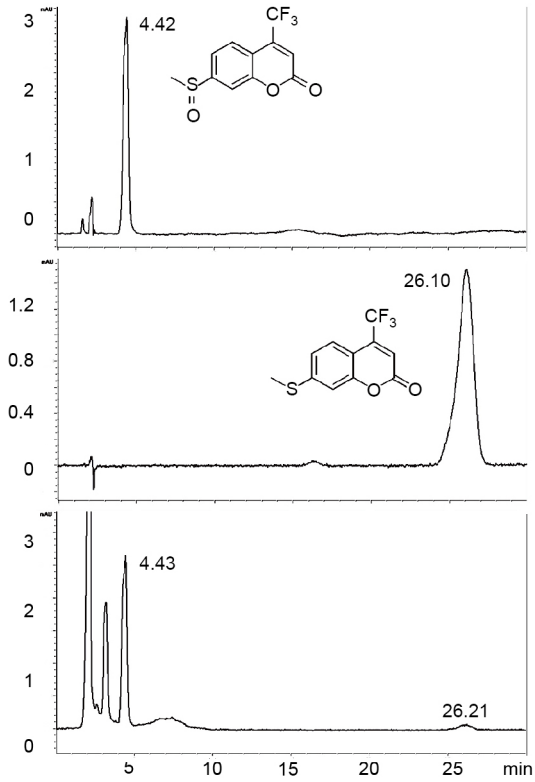


图 5 HPLC色谱产物鉴定. (a) 10 μM探针Msr-TFMCM (320 nm); (b) 化合物**1** (10 μM) (350 nm); (c) 探针Msr-TFMCM (10 μM)和200 nM Msr A在37℃作用6 h后(1~10 min, 320 nm; 10~30 min, 350 nm); 洗脱剂: 甲醇/三蒸水=6:4

3.4 Msr-TFMCM的干扰实验

选择性是衡量探针分子实用性能的一个重要指标, 因为测试体系往往是一个复杂体, 含有多种成分, 可能会造成一定的干扰. 为了实现在活细胞内检测Msr A活性, 接下来我们考察了探针Msr-TFMCM的选择性. 由于该探针是在被还原后产生荧光信号, 所以主要考察了一些具有还原性的物质. 将这些化合物与探针作用6 h后, 检测荧光强度的变化. 在图6中看到,

只有Msr A存在下引起了明显的荧光增强, 其他小分子化合物, 谷胱甘肽(GSH)、半胱氨酸(L-Cys)、高半胱氨酸(Hcy)、1,3-丙二硫醇、乙二硫醇、苯硫酚、抗坏血酸(Vc)、DTT和三(2-羧乙基)膦(TCEP)都没有产生影响, 表明探针Msr-TFMCM具有非常好的选择性.

3.5　裂解液实验

根据本课题组[33]先前的报道, 在不同的器官中, 小鼠的肾脏具有最高的Msrs活性, 因而选择小鼠肾脏裂解液, 依照探针与Msrs作用方法, 研究了探针Msr-TFMCM与不同浓度裂解液随时间的荧光变化. 在图7中, 在固定浓度的细胞裂解液下, 随着时间的增加, 荧光强度不断增加. 在特定的时间点, 细胞裂解液浓度越大, 荧光强度越大.

为了更好地说明探针Msr-TFMCM与Msrs作用, 我们进一步研究了探针Msr-TFMCM在抑制剂存在下与裂解液的荧光响应. DMSO、蛋氨酸亚砜(MetO)可以在Msrs催化下还原为相应的硫醚, 因此可以作为抑制剂抑制其催化还原活性. 将裂解液与不同浓度的抑制剂及探针Msr-TFMCM作用, 得到荧光随时间的变化, 如图8和9所示. 在抑制剂DMSO或MetO存在时, 同一

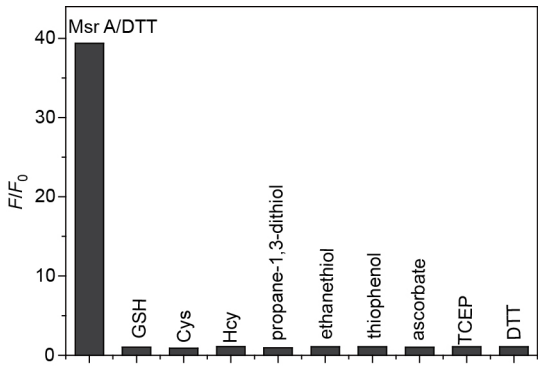


图 6　探针Msr-TFMCM与1 mM不同干扰物种(GSH、L-Cys、Hcy、1,3-丙二硫醇(propane-1,3-dithiol)、乙二硫醇(1,2-ethanedithiol)、苯硫酚(thiophenol)、Vc、TCEP、DTT)作用, 在495 nm处的荧光强度比值, λ_{ex}=350 nm

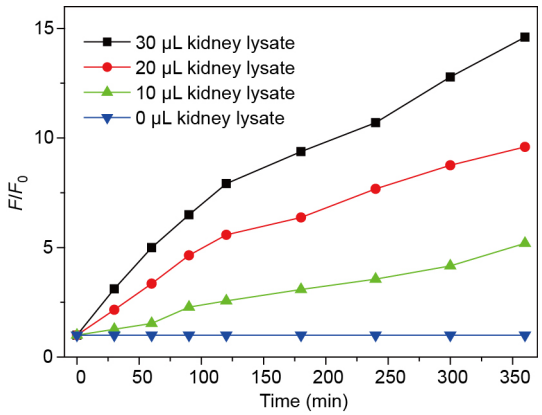


图 7　探针Msr-TFMCM (10 μM)与不同浓度小鼠肾裂解液作用, 在465 nm处荧光强度的比值随时间的变化曲线(λ_{ex}=350 nm). 图中10、20和30 μL裂解液对应在测试体系中的蛋白终浓度分别为300、600、900 μg/mL (网络版彩图)

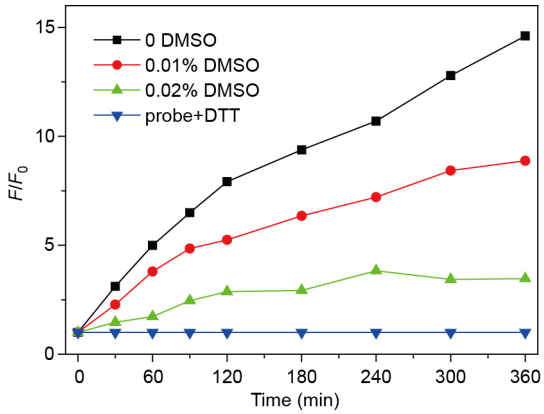


图 8　探针Msr-TFMCM (10 μM)在不同浓度抑制剂DMSO (0.01%, 0.02%)存在下, 与小鼠肾裂解液(900 μg/mL)作用, 在465 nm处荧光强度比值随时间的变化曲线, λ_{ex}=350 nm (网络版彩图)

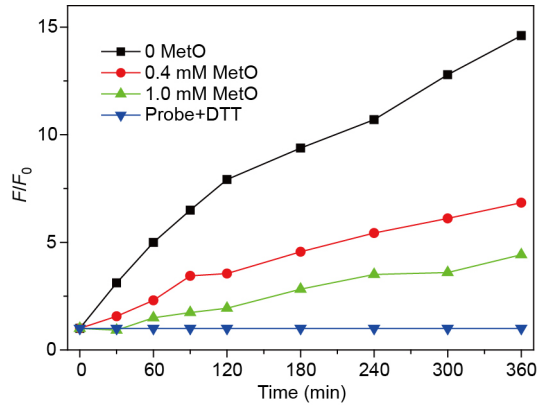


图 9　探针Msr-TFMCM (10 μM)在不同浓度抑制剂MetO (0.4 mM, 1.0 mM)存在下, 与小鼠肾裂解液(900 μg/mL)作用, 在465 nm处荧光强度比值随时间的变化曲线, λ_{ex}=350 nm (网络版彩图)

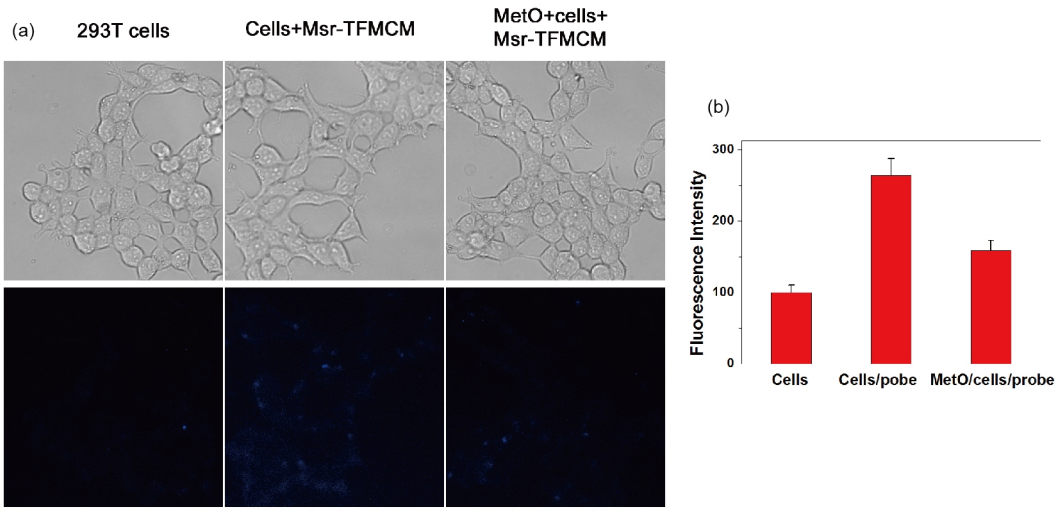


图 10 Msr-TFMCM在活细胞成像中的应用. (a) 左侧为293T细胞, 中间为Msr-TFMCM (20 μM)与293T细胞作用4 h图片, 右侧为Msr酶抑制剂MetO (5 mM)先与细胞作用30 min, 再与Msr-TFMCM (20 μM)作用4 h后的图片; (b) 细胞内相对荧光强度的定量(imageJ) (网络版彩图)

浓度时, 随时间的增加, 仍然会表现出荧光增强. 在同一时间下, DMSO或MetO浓度较小时, 裂解液与Msr-TFMCM作用释放的荧光越强, 浓度越大, 荧光增加越小. 以上结果表明, 探针与裂解液相互作用表现为荧光增强, 是由于其中的蛋氨酸亚砜还原酶的存在.

3.6 活细胞成像

以上结果表明, 探针Msr-TFMCM对蛋氨酸亚砜还原酶有专一性识别, 接下来进一步将Msr-TFMCM应用于细胞内的Msrs的可视化检测. 从图10中可以看出, 在细胞没有加探针时, 仅有非常微弱的背景荧光(图10(a), 左). 探针Msr-TFMCM与细胞作用4 h, 发出了很强的蓝色荧光(图10(a), 中). 这说明探针Msr-TFMCM可以用来实时监测活细胞内Msrs的活性. 同时可以看出, 通过加入抑制剂MetO, 细胞内的荧光信号明显地减弱(图10(a), 右). 由于存在一定的细胞背景干扰, 为了进一步说明细胞内的荧光变化, 通过imageJ进行了荧光定量(图10(b)). 虽然Msr-TFMCM较本课题组报道的首个变亮型探针Msr-blue的发射波长有了一定的红移, 但从此次的实验结果看出, Msr-TFMCM在活细胞成像的应用中仍然存在一定的背景干扰. 目前我们正在发展具有绿色或者红色发射波长的探针.

4 结论

综上所述, 基于蛋氨酸亚砜还原酶的催化还原机理及分子探针发光机制, 设计合成了一个新的蛋氨酸亚砜还原酶的探针Msr-TFMCM. 荧光光谱研究表明, Msr-TFMCM是一个高选择性的检测蛋氨酸亚砜还原酶的探针, 可以方便地应用于检测生物样品中该酶的活性, 这将为深入认识蛋氨酸亚砜还原酶在生理过程中的作用提供有效方法.

参考文献

1 Moskovitz J, Berlett BS, Poston JM, Stadtman ER. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 9585–9589
2 Weissbach H, Resnick L, Brot N. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1703: 203–212
3 Kantorow M, Lee W, Chauss D. *Exp Eye Res*, 2012, 100: 110–111
4 Brot N, Weissbach L, Werth J, Weissbach H. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, 78: 2155–2158
5 Grimaud R, Ezraty B, Mitchell JK, Lafitte D, Briand C, Derrick PJ, Barras F. *J Biol Chem*, 2001, 276: 48915–48920
6 Brunell D, Weissbach H, Hodder P, Brot N. *ASSAY Drug Dev Technol*, 2010, 8: 615–620

7 Kumar RA, Koc A, Cerny RL, Gladyshev VN. *J Biol Chem*, 2002, 277: 37527–37535
8 Dai C, Wang MH. *Mol Biol Rep*, 2012, 39: 6297–6308
9 Wu PF, Xie N, Zhang JJ, Guan XL, Zhou J, Long LH, Li YL, Xiong QJ, Zeng JH, Wang F, Chen JG. *J Nutr Biochem*, 2013, 24: 1070–1077
10 Wu PF, Zhang Z, Guan XL, Li YL, Zeng JH, Zhang JJ, Long LH, Hu ZL, Wang F, Chen JG. *Enzyme Microbial Tech*, 2013, 53: 391–397
11 Zhang L, Duan D, Liu Y, Ge C, Cui X, Sun J, Fang J. *J Am Chem Soc*, 2014, 136: 226–233
12 Li X, Gao X, Shi W, Ma H. *Chem Rev*, 2014, 114: 590–659
13 Yang Y, Zhao Q, Feng W, Li F. *Chem Rev*, 2013, 113: 192–270
14 Zhu H, Fan J, Wang B, Peng X. *Chem Soc Rev*, 2015, 44: 4337–4366
15 Xiao H, Li P, Hu X, Shi X, Zhang W, Tang B. *Chem Sci*, 2016, 7: 6153–6159
16 Yuan L, Lin W, Zheng K, He L, Huang W. *Chem Soc Rev*, 2013, 42: 622–661
17 Chen Y, Bai Y, Han Z, He W, Guo Z. *Chem Soc Rev*, 2015, 44: 4517–4546
18 Sun J, Zhang L, Zhang X, Hu Y, Ge C, Fang J. *Analyst*, 2016, 141: 2009–2015
19 Ma H, Zhang J, Zhang Z, Liu Y, Fang J. *Chem Commun*, 2016, 52: 12060–12063
20 Liu Y, Ma H, Zhang L, Cui Y, Liu X, Fang J. *Chem Commun*, 2016, 52: 2296–2299
21 Zhang Z, Zhang B, Qian X, Li Z, Xu Z, Yang Y. *Anal Chem*, 2014, 86: 11919–11924
22 Wu X, Shi J, Yang L, Han J, Han S. *Bioorg Med Chem Lett*, 2014, 24: 314–316
23 Yang X, Zhou Y, Zhang X, Yang S, Chen Y, Guo J, Li X, Qing Z, Yang R. *Chem Commun*, 2016, 52: 10289–10292
24 Zhang L, Cui X, Sun J, Wang Y, Li W, Fang J. *Bioorg Med Chem Lett*, 2013, 23: 3511–3514
25 Zhang L, Duan D, Cui X, Sun J, Fang J. *Tetrahedron*, 2013, 69: 15–21
26 Zhang L, Sun J, Liu S, Cui X, Li W, Fang J. *Inorganic Chem Commun*, 2013, 35: 311–314
27 Wu X, Li L, Shi W, Gong Q, Ma H. *Angew Chem Int Ed*, 2016, 55: 14728–14732
28 Xue Z, Zhao H, Liu J, Han J, Han S. *Chem Sci*, 2017, 8: 1915–1921
29 Zhu H, Fan J, Du J, Peng X. *Acc Chem Res*, 2016, 49: 2115–2126
30 Kwak GH, Choi SH, Kim JR, Kim HY. *BMB Rep*, 2009, 42: 580–585
31 Etienne F, Resnick L, Sagher D, Brot N, Weissbach H. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 312: 1005–1010
32 Makukhin N, Tretyachenko V, Moskovitz J, Míšek J. *Angew Chem Int Ed*, 2016, 55: 12727–12730
33 Zhang L, Peng S, Sun J, Yao J, Kang J, Hu Y, Fang J. *Chem Sci*, 2017, 8: 2966–2972
34 Wu Y, Xie G, Xu Y, Ma L, Tong C, Fan D, Du F, Yu H. *J Transl Med*, 2015, 13: 316
35 Ge C, Wang H, Zhang B, Yao J, Li X, Feng W, Zhou P, Wang Y, Fang J. *Chem Commun*, 2015, 51: 14913–14916

A novel fluorescent probe for methionine sulfoxide reductases

Liangwei Zhang[1], Ruijuan Liu[1], Jie Kang[1], Jinyu Sun[1], Yanan Hou[1], Hong Yu[2], Jianguo Fang[1*]

[1] *State Key Laboratory of Applied Organic Chemistry, College of Chemistry and Chemical Engineering, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China*
[2] *Department of Biochemistry and Molecular Biology, Wuhan University School of Basic Medical Sciences, Wuhan 430071, China*
**Corresponding author, E-mail: fangjg@lzu.edu.cn*

Abstract: Methionine sulfoxide reductase (Msr) enzymes have multiple functions such as antioxidant defense and protein repair, and play an important role in regulating cellular redox homeostasis. However, the investigation of the enzymes' function under physiological/pathological conditions is challenging as there are only limited probes available. In this work, we employed the trifluoromethyl coumarin as a fluorophore and the intramolecular charge transfer sensing mechanism to design a turn-on fluorescent probe, Msr-TFMCM. The methylsulfoxide group in Msr-TFMCM is specifically reduced by Msrs, giving a >50-fold increase of the emission intensity. The practical applications of the probe were demonstrated by imaging the enzymes' activity in live cells. Our results indicated that Msr-TFMCM could be used for specific monitoring Msrs activity.

Keywords: methionine sulfoxide reductase, fluorescent probe, trifluoromethyl coumarin, live cell imaging

doi: 10.1360/N032017-00053