

# 含硫生物分子的检测及成像技术的研究进展

夏超, 丁月旭\*

重庆市公共卫生医疗救治中心, 重庆

收稿日期: 2022年5月2日; 录用日期: 2022年5月16日; 发布日期: 2022年5月26日

## 摘要

硫化氢(H<sub>2</sub>S)及其氧化产物在许多生物过程中都具有重要的作用, 一些含硫生物分子如R-S-SH、R-S-Sn-S-R、H<sub>2</sub>S<sub>n</sub>等, 引起了人们的广泛关注。为描述它们在生理和病理生理中的作用, 需要有选择性的检测技术。传统上的氰解法可用于检测含硫生物分子, 但它在生物成像方面作用有限。随着各种化学检测技术不断发展, Tag-Switch技术、LC-MS/MS、拉曼光谱和荧光探针等技术均已用于检测含硫生物分子及其生物成像。为此, 我们将基于这些技术对含硫生物分子的检测、成像的研究进展进行综述, 以为后续设计开发更具实用价值的检测技术提供有益的参考。

## 关键词

含硫生物分子, 检测技术, 生物成像

# Recent Advances in Detection, Isolation, and Imaging Techniques for Sulfane Sulfur-Containing Biomolecules

Chao Xia, Yuexu Ding\*

Chongqing Public Health Medical Center, Chongqing

Received: May 2<sup>nd</sup>, 2022; accepted: May 16<sup>th</sup>, 2022; published: May 26<sup>th</sup>, 2022

## Abstract

Hydrogen sulfide and its oxidation products are involved in many biological processes, and sulfane sulfur compounds, which contain sulfur atoms bonded to other sulfur atom(s), as found in hydropersulfides (R-S-SH), polysulfides (R-S-Sn-S-R), hydrogen polysulfides (H<sub>2</sub>S<sub>n</sub>), etc., have at-

\*通讯作者。

tracted increasing interest. To characterize their physiological and pathophysiological roles, selective detection techniques are required. Classically, sulfane sulfur compounds can be detected by cyanolysis, but it is useful in biological imaging. Tag-switch techniques, LC-MS/MS, Raman spectroscopy, and fluorescent probes have been used to detect Sulfane Sulfur-Containing Biomolecules and their bioimaging. Herein, this review summarizes the techniques available for specific detection of sulfane sulfur species in biological contexts, in order to provide a useful reference for the subsequent design and development of more practical detection technology.

## Keywords

Sulfane Sulfur-Containing Biomolecules, Detection Techniques, Bioimaging

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

硫化氢( $H_2S$ )是人体内继 NO 和 CO 之后发现的第三种内源性气体信号分子。它主要由 L-半胱氨酸通过酶解反应产生。 $H_2S$  生理浓度介于 1 nmol 与 1 mmol 之间不等, 它参与一系列生理调控活动, 如调节血管舒张、神经传导、心肌收缩、细胞凋亡、炎症、缺血再灌注损伤及胰岛素分泌等[1]。 $H_2S$  因具有还原性而常作为体内活性氧和活性氮的清道夫, 细胞一旦无法维持正常的  $H_2S$  浓度, 则可能会导致阿尔兹海默氏症、唐氏综合征、胃黏膜损伤、高血压和肝硬化等疾病。此外,  $H_2S$  氧化产生的活性硫化物, 包括含 R-S-SH、R-S-Sn-S-R、 $H_2S_n$  等, 在各种生物过程中发挥着关键作用[2]。如半胱氨酸/谷胱甘肽等 h 含硫生物分子具有抗氧化和细胞保护的生理作用[3];  $H_2S_n$  参与了星形胶质细胞和背根神经节神经元的  $Ca^{2+}$  内流通道的激活[4]; 过量的  $H_2S$  和多硫化物可能是精神分裂症发病的病理生理学基础[5]。

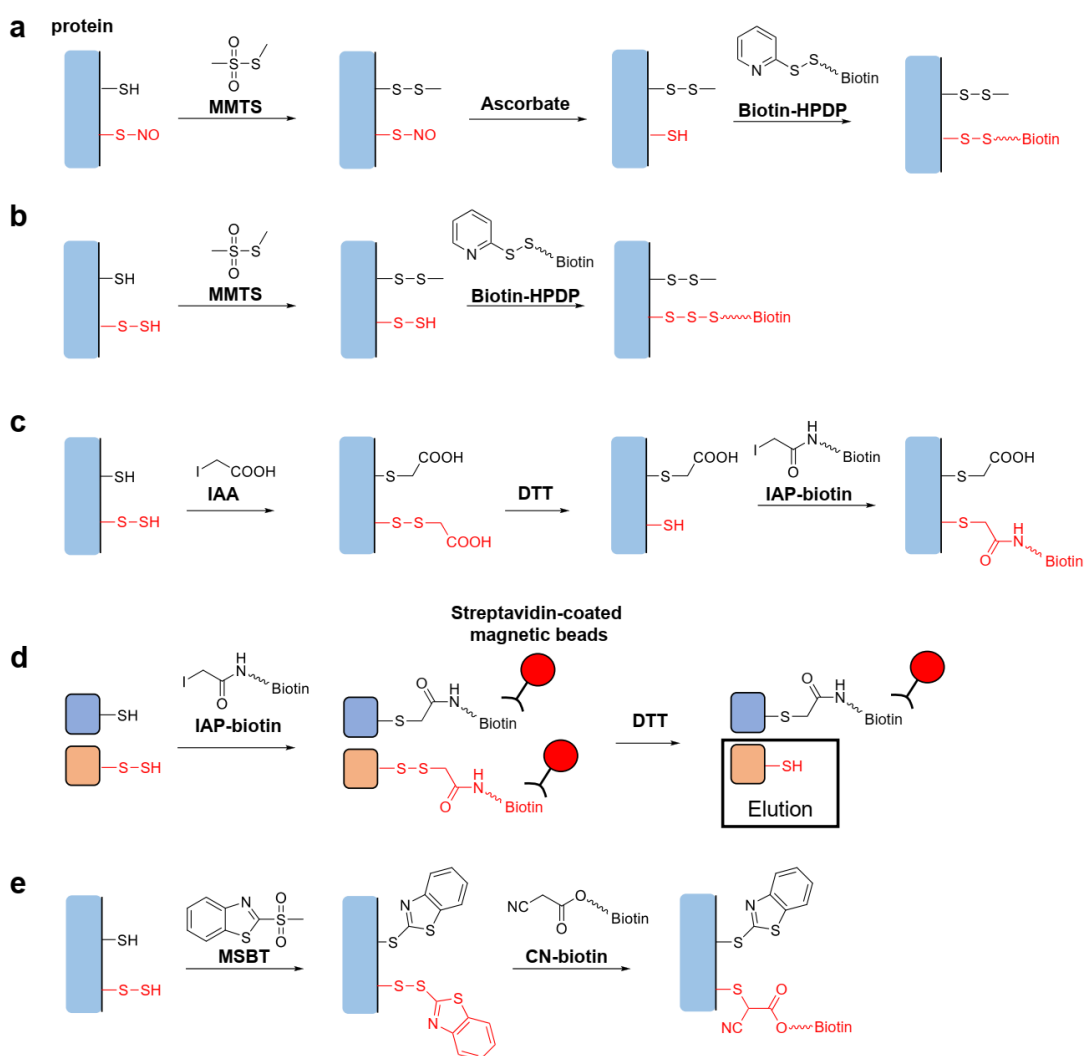
为了解含硫生物分子的生物学作用, 能够特异性检测含硫生物分子的化学技术至关重要。硫能与氰化物离子(CN<sup>-</sup>)反应生成硫氰酸盐(SCN<sup>-</sup>)。然而, 这种经典的方法不能用于生物样品中硫化蛋白的分离和鉴定, 也不能用于细胞和组织中硫化合物的生物成像。近年来, 硫醚类化合物作为亲核试剂和亲电试剂具有独特的化学性质不断探索, 从而推进了特异性检测新方法的发展。因此, 本文将基于不同检测方法以及生物样品中成像技术的最新进展进行综述。

## 2. Tag-Switch 技术

Tag-Switch 技术主要用于识别蛋白质翻译后的特定修饰, 开始是为了检测 S-NO 基团, 首先用甲基甲烷硫代磺酸盐(MMTS)阻断游离硫醇基团, 目标 S-NO 基团被抗坏血酸还原生成新的硫醇基团, 这些硫醇基团被含有吡啶二硫的生物素化试剂(biotin-HPDP) [6] (图 1(a))。这种生物素化蛋白可在链霉亲和分离用于进一步分析, 如十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)、免疫印迹等。

在生物素开关检测 S-NO 的基础上, 发展了几种检测蛋白质中过硫化半胱氨酸残基的新技术。Mustafa 等[7]报道, 在不经过抗坏血酸还原步骤的情况下, 依次添加 MMTS 和 biotin-HPDP, 可特异性地在小鼠肝脏中对过硫蛋白进行生物素酸化(图 1(b))。Krishnan 等[8]报道了另一种使用碘乙酸(IAA)的生物素开关技术。IAA 与硫醇和过硫化物基团都发生反应, 但随后的二硫苏糖醇(DTT)处理只减少过硫化物衍生产物的二硫键。这就生成了新的硫醇基, 这些硫醇基被碘乙酰-PEG2-生物素(IAP-biotin)特异性标记(图 1(c))。

但对其他半胱氨酸修饰、二硫键和 S-NO 的选择性有限。Doka 等[9]报道了一种方法, 在第一步使用 IAP-biotin 与硫醇和过硫化物基团反应, 当生物素化的蛋白质被捕捉在链霉亲和素包被的磁珠上, 最初含有过硫化物基团的蛋白质可以在断裂二硫键后被选择性洗脱, 从而释放出生物素部分(图 1(d))。利用这种技术, 他们定量了培养细胞和小鼠肝脏中蛋白质过硫化物的浓度。值得注意的是, 这种方法不受半胱氨酸残基其他氧化修饰的影响。Zhang 等[10]报道了一种针对过硫化物基团具有选择性的方法。他们开发了一种新的硫醇阻断剂甲基磺酰苯并噻唑(MSBT)。MSBT 与硫醇和过硫化物反应, 分别生成含硫醚和二硫键的产物, MSBT 标记的过硫化物中二硫键的反应活性增强, 使生物素连接的氰基化的生物素(CN-biotin)能够进行特异性选择(图 1(d))。经 Tag-Switch 技术特定修饰后, 可后续通过链霉亲和素和素连接材料检测和/或分离蛋白, 也可以用荧光团标记链霉亲和素对细胞内含硫深恶分子作用进行原位荧光成像[11]。这些 Tag-Switch 技术将为检测含硫生物分子的研究提供了良好的起点, 并可能阐明含硫生物分子信号传递的作用机制。



**Figure 1.** (a) Proposed mechanism of the tag-switch technique for the detection of nitrosothiol modification in proteins. (b)~(e) Proposed mechanisms of tag-switch techniques for the detection of cysteine per/polysulfides in proteins

**图 1.** (a) 标签开关技术检测蛋白质中 S-NO 基团的机制; (b)~(e) 用于检测蛋白质中含硫分子的机制

### 3. LC-MS/MS

LC-MS/MS 具有灵敏度高, 选择性强, 准确性好等特点, 已广泛应用于药物、食品、环境、法医、临床等各个领域。在使用 LC-MS/MS 检测生物样品中的含硫生物分子时, 首先要用烷基化试剂如一溴二锰(MBB)将样品烷基化, 过硫化物和多硫化物与 MBB 发生反应, 加合物可通过高效液相色谱扫描荧光检测器和串联质谱进行分析[12] (图 2(a))。Ida 等[10]采用 LC-MS/MS 分析了小鼠心脏中各种多硫化物的水平。他们定量了 MBB 修饰过硫化物和多硫化物, 如半胱氨酸过硫化物(CysSSH)、谷胱甘肽过硫化物(GSSH)、谷胱甘肽多硫化物(GSSSG)等, 并检测这些含硫生物分子在血浆和细胞中内源产生和维持。然而, 由于 MBB 的强亲电性, 可能导致多硫化物加合物在烷基化过程的分解[13]。因此, 另一种烷基化试剂  $\beta$ -(4-羟基苯基)乙基碘乙酰胺(HPE-IAM)具有较温和的亲电性, 可形成稳定的加合物, 而不会引起多硫化物的分解(图 2(b))。Akaike 等人成功地利用 HPE-IAM 精确定量了哺乳动物细胞中的各种水硫化物/多硫化物, 并确定半胱氨酸 tRNA 合成酶生物合成半胱氨酸过硫化物参与线粒体的电子传递链[14]。LC-MS/MS 检测含硫生物分子逐步得到发展, 可进一步灵敏度准确选择性的检测含硫生物分子, 有利于阐明含硫生物分子的作用机制。

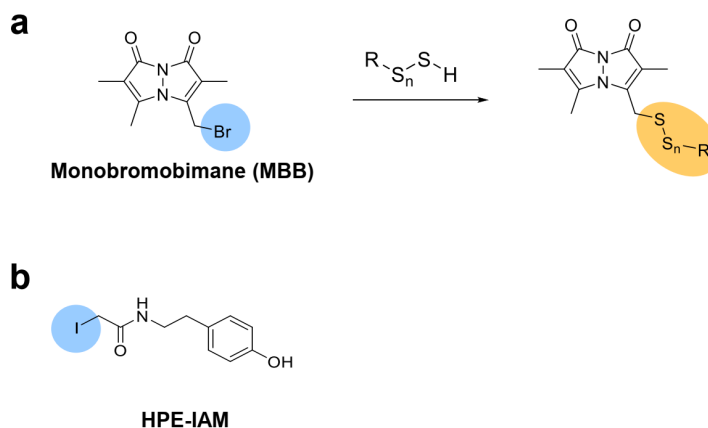


Figure 2. Chemical structures of MBB (a) and HPE-IAM (b)

图 2. MBB (a)和 HPE-IAM (b)的化学结构

### 4. 拉曼成像

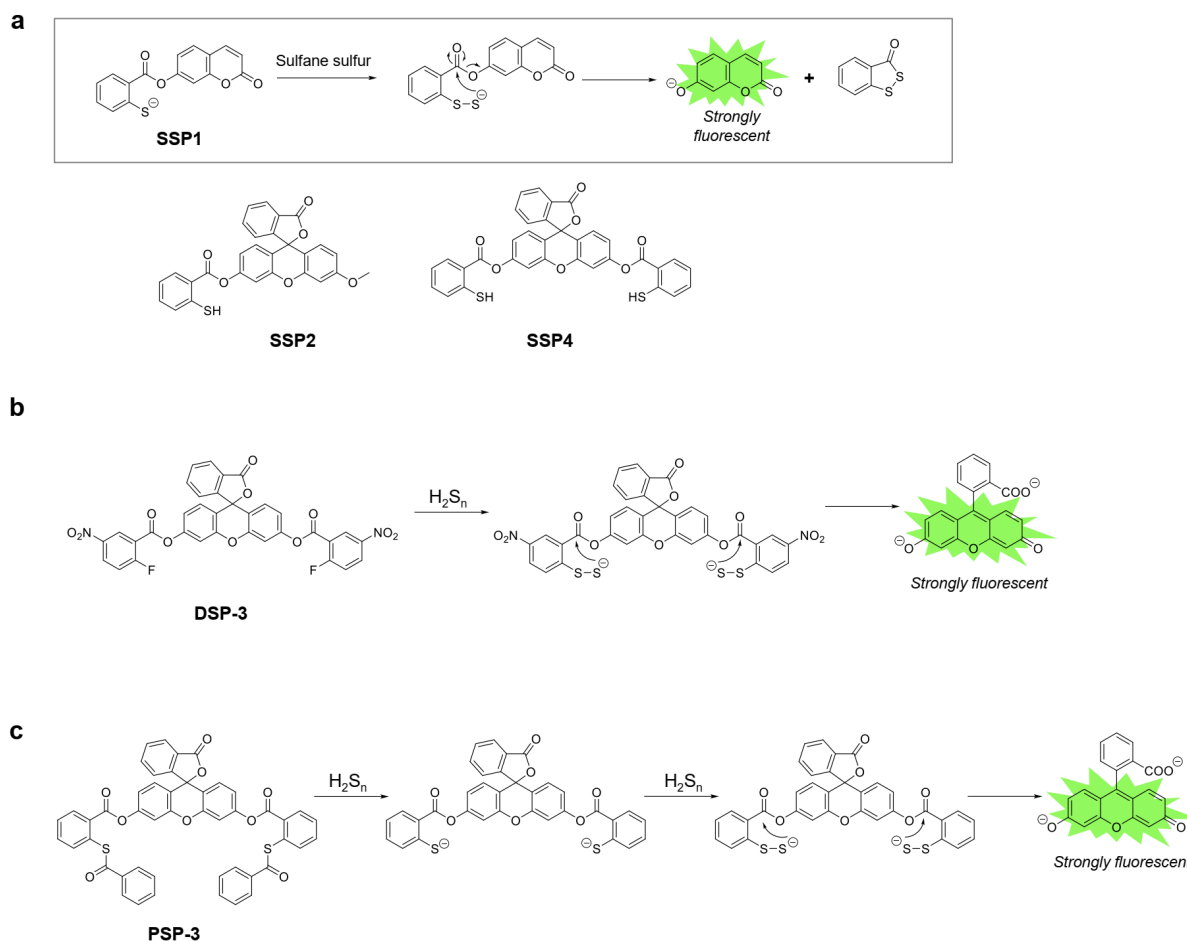
表面增强拉曼光谱(SERS)是一种非侵入性分析技术, 具有较高的灵敏度, SERS 技术已被广泛应用, 包括被用于单细胞水平或体外样本的生物成像。最近, Shiota 等[15]利用蚕豆状金纳米的随机阵列(GNF)检测到脑组织中内源性多硫化物的拉曼信号。GNF 产生许多电磁热点, 并能对分析物进行大面积可视化。他们将这一技术应用于小鼠胶质母细胞瘤同基因模型的代谢物的生物成像, 发现内源性多硫化物化合物可以在  $480\text{ cm}^{-1}$  处显示为一个峰值。Honda 等[16]使用同样的 SERS 技术来识别与某些卵巢癌化疗耐药机制相关的含硫代谢物。他们在透明细胞癌中观察到  $480\text{ cm}^{-1}$  处的 SERS 信号, 提示肿瘤组织中存在含硫生物分子。进一步发展针对含硫生物分子的拉曼成像技术, 可能会对恶性肿瘤有更深入的了解, 并为预测化疗疗效提供有力工具。

### 5. 荧光探针

荧光探针是合成的小分子或蛋白质, 在与目标分析物反应时发出荧光, 可用于活细胞和组织的实时成像。目前已开发出几种针对含硫生物分子的蛋白质荧光探针。Hu 等[17]报道了一种硫敏感的绿色荧光

蛋白(psGFP), 在硫源存在的情况下, 引入一对半胱氨酸残基形成二硫键, 改变 GFP 发光基团离子平衡, 从而引发 GFP 发光。蛋白质荧光探针可通过简单融合靶向信号肽在亚细胞器中的定位, 但开发的探针数量有限, 仍需进一步研究。

小分子探针具有合成容易、灵敏度高、穿透性强等特性, 因此有大量含硫生物分子的小分子探针被开发。Xian 的团队制备了一系列针对硫的荧光探针[18]。SSP1 和 SSP2 分别有一个发光团, 起初均无荧光。两个探针均含有一个硫醇基, 可与硫源反应生成苯二硫酮。该反应中间体在分子内自发环合释放荧光团, 产生强烈的荧光信号(图 3(a))。SSP1 和 SSP2 的选择性强, 与过硫化物供体( $\text{Na}_2\text{S}_2$ )反应后, 荧光增强分别为 25 倍和 50 倍, 但在半胱氨酸、GSH、 $\text{H}_2\text{S}$  等其他含硫生物分子反应不明显。此外, 另一种探针 SSP4 可检测细胞内含硫生物分子, 其具有两个硫反应位点(图 3(a)), 已被广泛用于硫硫物种的细胞内成像[19][20]。Xian 的团队还报道了用于检测  $\text{H}_2\text{S}_n$  的荧光探针 DSP-3, 其包含的 2-氟-5-硝基苯甲酸酯基团与  $\text{H}_2\text{S}_n$  发生亲核取代形成含有二硫键的中间体, 中间体分子内自发环合释放荧光团, 产生强烈的荧光信号(图 3(b)) [21]。另一种探针 PSP-3, 其硫酯与  $\text{H}_2\text{S}_n$  反应形成含有二硫键的中间体, 进一步环化释放荧光团, 产生强烈的荧光信号, 其机理与 SSP-3 相同(图 3(c)) [22]。

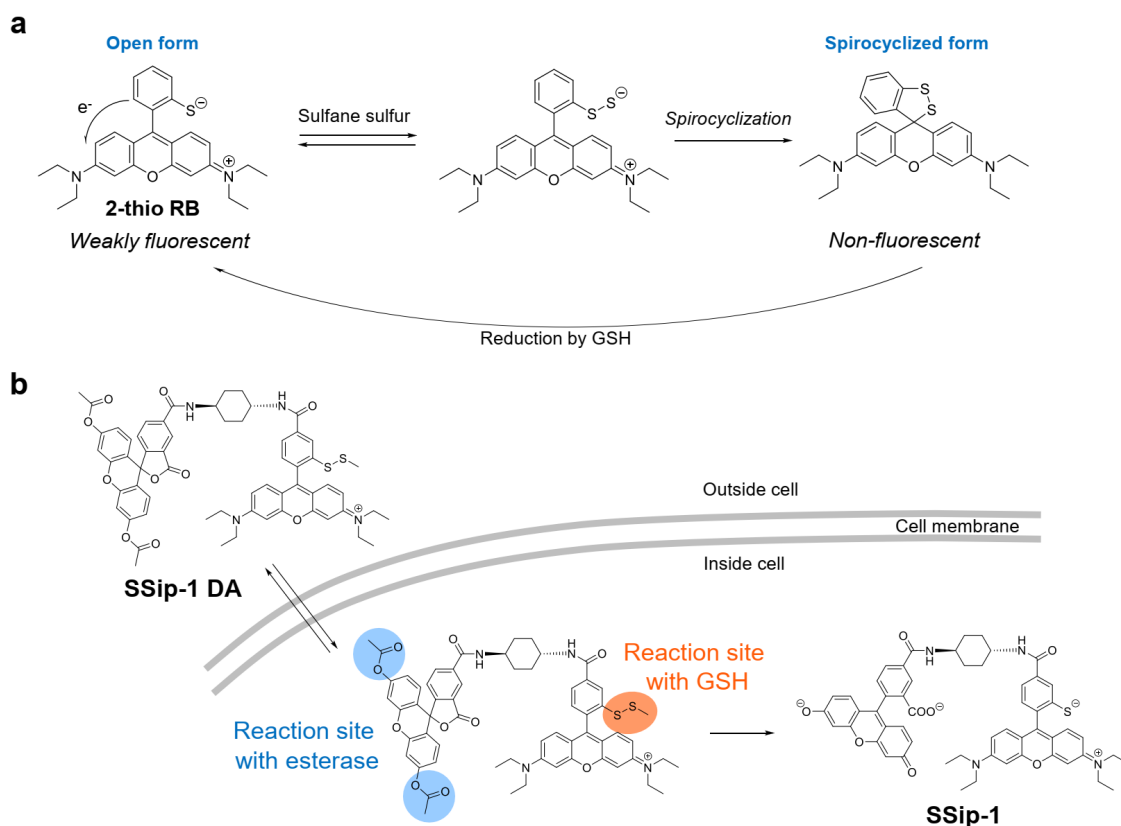


**Figure 3.** (a) Chemical structures of the SSP series and the proposed reaction mechanism with sulfane sulfur. (b) Chemical-structure of DSP-3 and its reaction mechanism with hydrogen polysulfides; (c) Chemical structure of PSP-3 and its reaction mechanism with hydrogen polysulfides

**图 3.** (a) SSP 系列的化学结构及其反应机理; (b) DSP-3 的化学结构及其反应机理; (c) PSP-3 的化学结构及其反应机理

SSP, PSP 和 DSP 系列化合物是不可逆荧光探针。Takano 等开发了一种可逆荧光探针 SSip-1 可动态监测细胞内的含硫分子。SSip-1 因分子内的能量转移而不具有荧光, 当其与含硫分子形成二硫键和黄嘌呤染料的分子内螺环化反应, 从而产生强烈荧光。当进一步加入 5 mM 的 GSH 时, 二硫键被还原从而导致荧光消失(图 4(a)) [23]。该课题组还开发了一种具有细胞膜渗透性的探针 SSip-1 DA, 它是 SSip-1 的二乙酰化和巯基保护衍生物, 探针进入细胞后乙酰基会被胞内酯酶水解, 二硫键会被 GSH 还原, 从而释放 SSip-1。当探针与 A549 细胞孵育后在加入  $\text{Na}_2\text{S}_4$  后显示细胞内荧光增强, 进一步孵育 30 min 后, 荧光强度下降(图 4(b)), 在第二次添加  $\text{Na}_2\text{S}_4$  后, 荧光再次迅速增强, 进一步孵育 30 min 后, 荧光强度再次下降。这个检测周期至少可以重复三次, 说明 SSip-1 可以可逆地检测出活细胞多硫化氢[4]。

荧光探针是研究含硫生物分子在活细胞和组织中的生理作用的有效化学工具, 尽管用于含硫生物分子检测、成像的荧光探针取得了巨大进展, 但含硫生物分子的确切生物学功能仍有待完全确定。因此, 要进一步开发实用的荧光探针作为研究含硫生物分子生物学的工具。



**Figure 4.** (a) Chemical structures of the SSip-1 and its reaction mechanism; (b) Chemical structure of SSip-1 DA and its reaction mechanism with hydrogen polysulfides

**图 4.** (a) SSip-1 的化学结构及反应机理; (b) SSip-1 DA 的化学结构及反应机理

## 6. 结论

本文简要介绍了含硫生物分子(如过硫化物和多硫化物)的检测技术。这些方法的进一步发展能实现可视化动态检测活细胞或组织中的含硫生物分子。此外, 结合不同的检测技术将有助于揭示含硫生物分子在氧化还原生物学中的生理和病理生理作用。因此, 进一步开发含硫生物分子的检测及生物成像技术具有重大意义。



## 基金项目

- 1) 重庆市公共卫生医疗救治中心院内项目 2019YNXM01;
- 2) 重庆市科学技术局技术预见与制度创新专项项目 cstc2020jsyj-zzysbAX0061。

## 参考文献

- [1] Paul, B.D. and Snyder, S.H. (2012) H<sub>2</sub>S Signalling through Protein Sulfhydration and beyond. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **13**, 499-507. <https://doi.org/10.1038/nrm3391>
- [2] Mishanina, T.V., Libiad, M. and Banerjee, R. (2015) Biogenesis of Reactive Sulfur Species for Signaling by Hydrogen Sulfide Oxidation Pathways. *Nature Chemical Biology*, **11**, 457-464. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1834>
- [3] Ida, T., Sawa, T., Ihara, H., Tsuchiya, Y., Watanabe, Y., Kumagai, Y., Suematsu, M., Motohashi, H., Fujii, S., Matsunaga, T., Yamamoto, M., Ono, K., Devarie-Baez, N.O., Xian, M., Fukuto, J.M. and Akaike, T. (2014) Reactive Cysteine Persulfides and S-Polythiolation Regulate Oxidative Stress and Redox Signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **111**, 7606-7611. <https://doi.org/10.1073/pnas.1321232111>
- [4] Miyamoto, R., Koike, S., Takano, Y., Shibuya, N., Kimura, Y., Hanaoka, K., Urano, Y., Ogasawara, Y. and Kimura, H. (2017) Polysulfides (H<sub>2</sub>S<sub>n</sub>) Produced from the Interaction of Hydrogen Sulfide (H<sub>2</sub>S) and Nitric Oxide (NO) Activate TRPA1 Channels. *Scientific Reports*, **7**, Article No. 45995. <https://doi.org/10.1038/srep45995>
- [5] Ide, M., Ohnishi, T., Toyoshima, M., Balan, S., Maekawa, M., Shimamoto-Mitsuyama, C., Iwayama, Y., Ohba, H., Watanabe, A., Ishii, T., Shibuya, N., Kimura, Y., Hisano, Y., Murata, Y., Hara, T., Morikawa, M., Hashimoto, K., Nozaki, Y., Toyota, T., Wada, Y., Tanaka, Y., Kato, T., Nishi, A., Fujisawa, S., Okano, H., Itokawa, M., Hirokawa, N., Kunii, Y., Kakita, A., Yabe, H., Iwamoto, K., Meno, K., Katagiri, T., Dean, B., Uchida, K., Kimura, H. and Yoshikawa, T. (2019) Excess Hydrogen Sulfide and Polysulfides Production Underlies a Schizophrenia Pathophysiology. *EMBO Molecular Medicine*, **11**, e10695. <https://doi.org/10.15252/emmm.201910695>
- [6] Forrester, M.T., Foster, M.W., Benhar, M. and Stamler, J.S. (2009) Detection of Protein S-Nitrosylation with the Biotin-Switch Technique. *Free Radical Biology and Medicine*, **46**, 119-126. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.09.034>
- [7] Mustafa, A.K., Gadalla, M.M., Sen, N., Kim, S., Mu, W., Gazi, S.K., Barrow, R.K., Yang, G., Wang, R. and Snyder, S.H. (2009) H<sub>2</sub>S Signals through Protein S-Sulfhydration. *Science Signaling*, **2**, ra72. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2000464>
- [8] Krishnan, N., Fu, C., Pappin, D.J. and Tonks, N.K. (2011) H<sub>2</sub>S-Induced Sulfhydration of the Phosphatase PTP1B and Its Role in the Endoplasmic Reticulum Stress Response. *Science Signaling*, **4**, ra86. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2002329>
- [9] Dóka, É., Pader, I., Bíró, A., Johansson, K., Cheng, Q., Ballagó, K., Prigge, J.R., Pastor-Flores, D., Dick, T.P., Schmidt, E.E., Arnér, E.S. and Nagy, P. (2016) A Novel Persulfide Detection Method Reveals Protein Persulfide- and Polysulfide-Reducing Functions of Thioredoxin and Glutathione Systems. *Science Advances*, **2**, e1500968. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1500968>
- [10] Zhang, D., Macinkovic, I., Devarie-Baez, N.O., Pan, J., Park, C.M., Carroll, K.S., Filipovic, M.R. and Xian, M. (2014) Detection of Protein S-Sulfhydration by a Tag-Switch Technique. *Angewandte Chemie International Edition*, **53**, 575-581. <https://doi.org/10.1002/anie.201305876>
- [11] Wedmann, R., Onderka, C., Wei, S., Szejtártó, I.A., Miljkovic, J.L., Mitrovic, A., Lange, M., Savitsky, S., Yadav, P.K., Torregrossa, R., Harrer, E.G., Harrer, T., Ishii, I., Gollasch, M., Wood, M.E., Galardon, E., Xian, M., Whiteman, M., Banerjee, R. and Filipovic, M.R. (2016) Improved Tag-Switch Method Reveals that Thioredoxin Acts as Depersulfidase and Controls the Intracellular Levels of Protein Persulfidation. *Chemical Science*, **7**, 3414-3426. <https://doi.org/10.1039/C5SC04818D>
- [12] Liu, H., Radford, M.N., Yang, C.T., Chen, W. and Xian, M. (2019) Inorganic Hydrogen Polysulfides: Chemistry, Chemical Biology and Detection. *British Journal of Pharmacology*, **176**, 616-627. <https://doi.org/10.1111/bph.14330>
- [13] Bogdándi, V., Ida, T., Sutton, T.R., Bianco, C., Ditrói, T., Koster, G., Henthorn, H.A., Minnion, M., Toscano, J.P., van der Vliet, A., Pluth, M.D., Feelisch, M., Fukuto, J.M., Akaike, T. and Nagy, P. (2019) Speciation of Reactive Sulfur Species and Their Reactions with Alkylating Agents: Do We Have Any Clue about What Is Present inside the Cell? *British Journal of Pharmacology*, **176**, 646-670. <https://doi.org/10.1111/bph.14394>
- [14] Akaike, T., Ida, T., Wei, F.Y., Nishida, M., Kumagai, Y., Alam, M.M., Ihara, H., Sawa, T., Matsunaga, T., Kasamatsu, S., Nishimura, A., Morita, M., Tomizawa, K., Nishimura, A., Watanabe, S., Inaba, K., Shima, H., Tanuma, N., Jung, M., Fujii, S., Watanabe, Y., Ohmuraya, M., Nagy, P., Feelisch, M., Fukuto, J.M. and Motohashi, H. (2017) Cysteinyl-tRNA Synthetase Governs Cysteine Polysulfidation and Mitochondrial Bioenergetics. *Nature Communications*, **8**,

Article No. 1177. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01311-y>

- [15] Shiota, M., Naya, M., Yamamoto, T., Hishiki, T., Tani, T., Takahashi, H., Kubo, A., Koike, D., Itoh, M., Ohmura, M., Kabe, Y., Sugiura, Y., Hiraoka, N., Morikawa, T., Takubo, K., Suina, K., Nagashima, H., Sampetean, O., Nagano, O., Saya, H., Yamazoe, S., Watanabe, H. and Suematsu, M. (2018) Gold-Nanofève Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Visualizes Hypotaurine as a Robust Anti-Oxidant Consumed in Cancer Survival. *Nature Communications*, **9**, Article No. 1561. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03899-1>
- [16] Honda, K., Hishiki, T., Yamamoto, S., Yamamoto, T., Miura, N., Kubo, A., Itoh, M., Chen, W.Y., Takano, M., Yoshikawa, T., Kasamatsu, T., Sonoda, S., Yoshizawa, H., Nakamura, S., Itai, Y., Shiota, M., Koike, D., Naya, M., Hayakawa, N., Naito, Y., Matsuura, T., Iwaisako, K., Masui, T., Uemoto, S., Nagashima, K., Hashimoto, Y., Sakuma, T., Matsubara, O., Huang, W., Ida, T., Akaike, T., Masugi, Y., Sakamoto, M., Kato, T., Ino, Y., Yoshida, H., Tsuda, H., Hiraoka, N., Kabe, Y. and Suematsu, M. (2021) On-Tissue Polysulfide Visualization by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Benefits Patients with Ovarian Cancer to Predict Post-Operative Chemosensitivity. *Redox Biology*, **41**, Article ID: 101926. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.101926>
- [17] Hu, X., Li, H., Zhang, X., Chen, Z., Zhao, R., Hou, N., Liu, J., Xun, L. and Liu, H. (2019) Developing Polysulfide-Sensitive GFPs for Real-Time Analysis of Polysulfides in Live Cells and Subcellular Organelles. *Analytical Chemistry*, **91**, 3893-3901. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b04634>
- [18] Chen, W., Liu, C., Peng, B., Zhao, Y., Pacheco, A. and Xian, M. (2013) New Fluorescent Probes for Sulfane Sulfurs and the Application in Bioimaging. *Chemical Science*, **4**, 2892-2896. <https://doi.org/10.1039/c3sc50754h>
- [19] Yadav, P.K., Martinov, M., Vitvitsky, V., Seravalli, J., Wedmann, R., Filipovic, M.R. and Banerjee, R. (2016) Biosynthesis and Reactivity of Cysteine Persulfides in Signaling. *Journal of the American Chemical Society*, **138**, 289-299. <https://doi.org/10.1021/jacs.5b10494>
- [20] Kimura, Y., Toyofuku, Y., Koike, S., Shibuya, N., Nagahara, N., Lefer, D., Ogasawara, Y. and Kimura, H. (2015) Identification of H<sub>2</sub>S<sub>3</sub> and H<sub>2</sub>S Produced by 3-Mercaptopyruvate Sulfurtransferase in the Brain. *Scientific Reports*, **5**, Article No. 14774. <https://doi.org/10.1038/srep14774>
- [21] Liu, C., Chen, W., Shi, W., Peng, B., Zhao, Y., Ma, H. and Xian, M. (2014) Rational Design and Bioimaging Applications of Highly Selective Fluorescence Probes for Hydrogen Polysulfides. *Journal of the American Chemical Society*, **136**, 7257-7260. <https://doi.org/10.1021/ja502968x>
- [22] Chen, W., Rosser, E.W., Matsunaga, T., Pacheco, A., Akaike, T. and Xian, M. (2015) The Development of Fluorescent Probes for Visualizing Intracellular Hydrogen Polysulfides. *Angewandte Chemie International Edition*, **54**, 13961-13965. <https://doi.org/10.1002/anie.201506887>
- [23] Takano, Y., Hanaoka, K., Shimamoto, K., Miyamoto, R., Komatsu, T., Ueno, T., Terai, T., Kimura, H., Nagano, T. and Urano, Y. (2016) Development of a Reversible Fluorescent Probe for Reactive Sulfur Species, Sulfane Sulfur, and Its Biological Application. *Chemical Communications*, **53**, 1064-1067. <https://doi.org/10.1039/C6CC08372B>