

专 论

水溶性聚苐衍生物的合成、性质与生物检测应用

王 树^{*}

(中国科学院化学研究所, 有机固体重点实验室, 北京 100190)

摘要: 共轭聚合物具有强的光捕获能力, 可用来放大荧光传感信号, 大大提高检测的灵敏度。基于共轭聚合物的新型生物传感体系对于阐明生物体系中的信息传递, 特别是对疾病的早期诊断方面具有重要的应用前景。水溶性聚苐衍生物由于具有很好的化学和热稳定性、高的荧光量子产率以及 C9 位易于修饰等特性, 近年来在生物传感领域得到了广泛应用。本文简要介绍了水溶性聚苐衍生物的设计与合成、荧光信号放大机制以及在生物检测方面的应用, 最后对该领域未来发展趋势进行了展望。

关键词: 水溶性聚苐; 设计与合成; 光物理性质; 生物检测

引言

生物分子(如核酸、蛋白质、细胞)的识别、检测对获取生命过程中的化学与生物信息、阐明生物体系中的信息传递、特别是对疾病的诊断与治疗都具有重要的意义。然而, 由于绝大多数生物分子本身在与目标分子结合时不能产生明显的光学或电学性质的变化, 所以天然生物分子不能作为导体传输生物识别信号。目前研究生物大分子的常用方法有凝胶电泳、高效液相色谱(HPLC)、核磁共振(NMR)、免疫着色法以及酶联免疫分析法(ELISA)等, 虽然这些方法具有各自的优点, 但具有操作时间长、所需分析样品量大、操作繁琐、甚至需要放射性同位素标记等缺点。相对于天然的生物分子, 半合成的生物复合光学有机功能材料由于结合了生物分子的灵敏性、特异性和非生物光学有机功能材料, 比如共轭聚合物与纳米粒子, 稳定的物理性质和优异的光学响应性, 可以克服这些难题。这些生物复合材料可以将生物结合以及生物识别事件转化为可测的光学信号。

在光化学传感器研究中, 作为光学识别信号转换功能的敏感材料是影响传感器性能的最重要因素之一, 它决定了传感器的检测灵敏性。因此, 设计、发展优良的敏感材料一直是传感器研究的热点。近年来, 水溶性共轭聚合物作为生物传感元件, 在核酸、蛋白质以及生物活性分子等方面的研究越来越受到人们的关注^[1~5]。1995 年 Swager 等首次提出了共轭聚合物荧光增幅特性的概念, 他们用实验证明了这种增幅性能主要是因为共轭聚合物的“分子导线”的功能, 使检测信号灵敏度大大提高^[6]。1999 年 Whitten 等设计了 QTL(quencher-tether-ligand)生物分子探针, 首次利用共轭聚合物荧光增幅的性质发展了蛋白质传感器, 并将这一方法扩展到蛋白酶和蛋白激酶的检测, 检测限可达到皮克级^[7]。近十年来, 经过国内外众多科学工作者的共同努力, 共轭聚合物作为荧光探针已经被成功应用于基因检测、蛋白质/酶浓度及活性测定、抗原-抗体识别、细菌检测以及细胞成像等一系列研究。目前, 共轭聚合物与生命科学的交叉学科吸引了众多科研工作者的兴趣, 基于共轭聚合物的新型生物传感器在医疗诊断、基因突变观测、基因传输监控、环境检测以及国家安全防御等方面展现了广泛的应用前景, 是目前共轭聚合物研究的热点之一。

基金项目: 国家杰出青年基金(No. 20725308);

作者简介: 王树(1972—), 男, 河北沧县人, 研究员, 研究方向为共轭聚合物荧光探针的合成与生物传感研究;

^{*} 通讯联系人; E-mail: wangshu@ccas.ac.cn.

1 水溶性聚芴衍生物的合成

由于共轭聚合物的主链一般具有刚性的平面结构, 因此很难熔融和溶解。但是, 通过聚合物侧链的修饰, 可以改变聚合物的溶解性、熔解能力, 而且通过在聚合物的侧链共价连接上亲水基团, 如季铵盐、羧基盐、磺酸基、冠醚链以及多羟基化合物等亲水基团还可得到水溶性共轭聚合物^[8]。侧链所带有的电荷使得共轭聚合物可以与带相反电荷的生物分子如蛋白质、核酸等发生相互作用。

较常用的几种用于生物检测的水溶性共轭聚合物有聚苯撑乙烯、聚噻吩、聚苯乙炔、聚苯和聚芴等⁹。其中水溶性聚芴是一类非常重要的光学生物传感材料, 具备优良的光学传感性质。和其它共轭聚合物相同, 聚芴具有刚性主链和很好的化学和热稳定性。而且聚芴还具有高的量子产率并且其 C9 位较活泼易于修饰侧链^[10]。水溶性的聚芴衍生物主要是通过 C9 位侧链修饰上亲水的离子基团, 主要有阳离子和阴离子两种。由于侧链带有阳离子基团的聚合物能与带有负电荷的 DNA、RNA 和蛋白质等形成静电复合物从而实现特异识别, 阳离子水溶性聚芴衍生物被广泛研究。被广泛应用的阳离子聚合物主要是含有季铵盐类基团的聚合物。2002 年 Bazan 研究小组^[11]首先合成了阳离子的聚芴衍生物 **PF-1** (如图 1 1 所示)。他们首先将侧链为二甲胺基的芴单体 **1** 和苯二硼酸 **2** 通过 $\text{PdCl}_2(\text{dppf})$ 催化在 THF/ H_2O 溶液中进行 Suzuki 聚合得到了侧链含有二甲胺基的共聚物 **3**, 然后加入碘甲烷将二甲胺基季铵化得到了水溶性聚芴衍生物 **PF-1**。

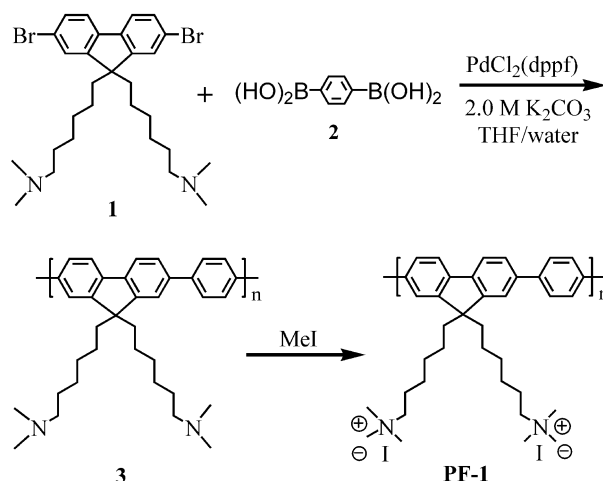
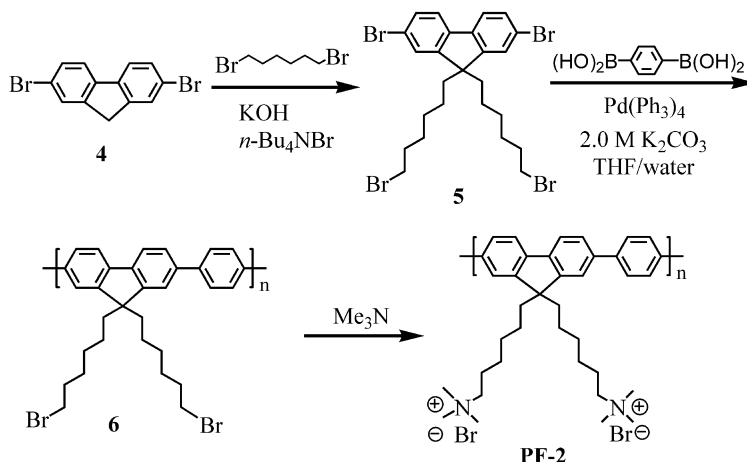
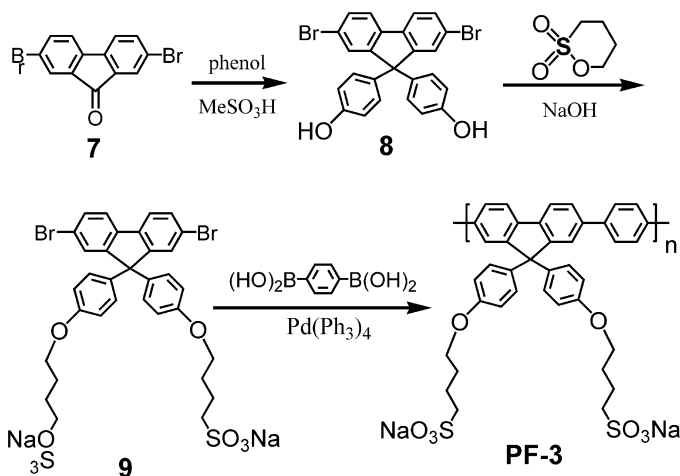


图 1 阳离子水溶性聚芴衍生物 **PF-1** 的合成路线

Figure 1 The synthetic scheme of the water-soluble copolymer **PF-1**

由于以上合成路线中的带有胺基侧链的芴单体不易分离纯化, Bazan 小组^[12]又在先前的合成路线上加以改进, 设计了新的路线合成了阳离子水溶性聚芴衍生物 **PF-2** (如图 2 所示)。他们首先在芴单体的 C9 位修饰上末端为溴取代的烷基链。同样, 将芴单体 **5** 和苯二硼酸通过 $\text{PdCl}_2(\text{dppf})$ 催化的 Suzuki 聚合得到了侧链末端为溴取代的共聚物 **6**, 随后利用三甲胺与聚合物溴代末端反应得到水溶性聚芴衍生物 **PF-2**。2004 年, Burrows 等^[13]首先合成了侧链末端带有磺酸基的阴离子聚芴 **PF-3** (如图 3 所示)。

非离子型的水溶性聚芴衍生物也引起了人们的研究兴趣, 它可以满足研究者们不希望聚合物带有电荷的需要。非离子型聚芴衍生物的侧链上带有亲水性的冠醚或高密度的氧原子后, 最为常见的是寡聚乙二醇链, 也能够使聚合物具有一定的水溶性, 尤其是带有多个羟基链端后聚合物的水溶性会显著提高。总之, 水溶性聚芴衍生物通常具有疏水性的骨架和亲水性的侧链。骨架往往是根据其光电性质进行选择的, 而侧链则需要同时考虑到亲水性、吸电子或推电子效应以及分子识别等因素。

图2 阳离子水溶性聚芴衍生物 **PF-2** 的合成路线Figure 2 The synthetic scheme of the water soluble copolymer **PF-2**图3 阴离子水溶性聚芴衍生物 **PF-3** 的合成路线Figure 3 The synthetic scheme of the water soluble copolymer **PF-3**

2 水溶性聚芴衍生物的光物理性质与传感机制

水溶性聚芴衍生物和非水溶性聚芴衍生物相同都是蓝光发射的聚合物,都具有 380 nm 左右的最大吸收峰和 420 nm 左右的荧光发射峰(如图 4 所示)。聚芴衍生物在有机溶剂中具有很高的荧光量子产率 ($> 80\%$),但是水溶性聚芴衍生物在水相体系中的量子产率只有 $20\% \sim 40\%$,并且和取代基所带的电负性、取代基中离子的种类以及溶液中的离子种类等密切相关^[1]。水溶性聚芴衍生物量子产率的降低主要是由于聚合物主链的强疏水作用使得聚合物主链发生聚集而引起自淬灭。另外,由于电子/能量可以在聚合物链内或链间快速的移动使得共轭聚合物可以从最低的能带发射荧光,因此,水溶和非水溶的聚芴衍生物的荧光寿命通常都可以达到纳秒级。水溶性聚芴衍生物的光学性质还受到聚合物主链的重复单元数以及溶剂的极性等因素的影响。Wang 等^[14]通过合成不同长度的水溶性的寡聚芴分子研究了重复单元数对于光学性质的影响,他们分别合成了含有 2、4 和 6 个水溶性芴单元的寡聚物,研究光学性质发现,随着芴单元数的增加,寡聚物的最大吸收峰和荧光发射峰都逐渐红移,而量子产率逐渐降低,当重复单元数为 6 个时,寡聚物的紫外和荧光性质和聚合物几乎相同,不再发生变化。另外,溶剂的极性可影响聚合物的聚集态从而影响聚合物的光学性质。

1995 年 Swager 等^[28, 30]首次提出了水溶性共轭发光聚合物“分子导线”的机理。当淬灭剂结合到聚

合物链上的任何一个位点时,都会阻碍整条链上的电子或能量流动,从而改变其荧光特性,即一个淬灭剂分子可能淬灭整条共轭聚合物链发出的荧光,这样就产生了增强的电子传递淬灭效果^[6]。

目前基于水溶性聚芴衍生物的生物传感主要有两种机理:(1)基于能量/电子转移过程的传感;(2)基于聚合物聚集态变化的传感^[15]。图 5 概括了基于水溶性聚芴衍生物的几种常见的传感方式,基本上包括荧光(给体或受体)或能量转移的“turn-on”和“turn-off”两种方式。其中 a 图描述的是目前大部分的 CPE 作为荧光探针的 DNA 分析策略,尽管实际的处理方式有所不同,环节可能较复杂,但最后的决定性检测步骤除个别的涉及较复杂机理(比如含苯并噻唑单元的聚芴)的分析方法外,利用的总是静电因素调控的能量转移过程。b 图不限于 DNA 的分析,更多的是用于蛋白质的检测或酶活性的分析,而且聚合物和猝灭基团(广义的猝灭,能量转移也包括在内)之间的作用方式可以是共价连接的,也可以是通过静电作用、疏水作用等非共价方式,包括了体系对外界响应时猝灭基团的接近或远离、生成或破坏(化学反应)所导致的体系光学性质的改变。

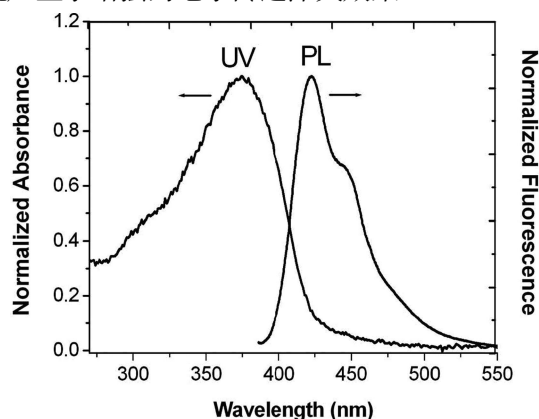


图 4 水溶性聚芴衍生物的紫外可见吸收光谱和荧光光谱图

Figure 4 The absorption and fluorescence spectra of water-soluble polyfluorenes

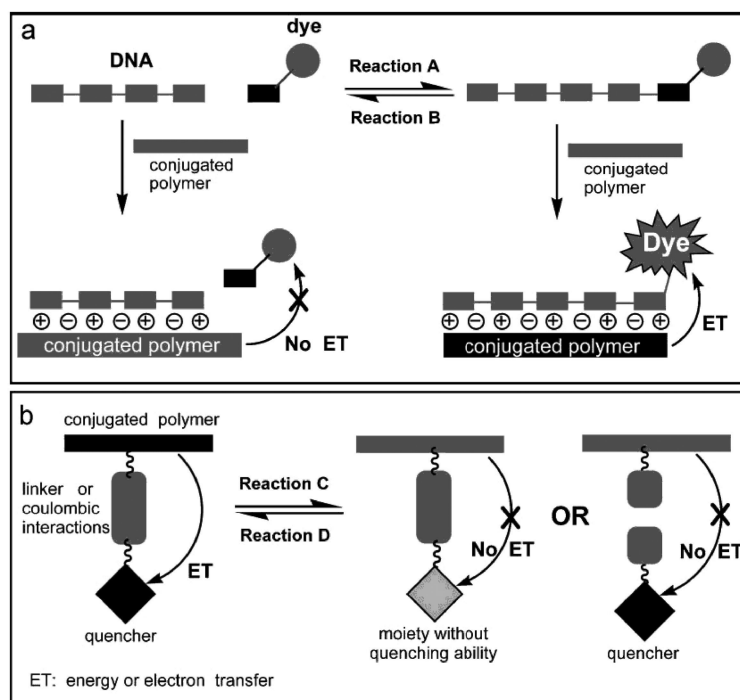


图 5 基于水溶性聚芴衍生物传感示意图

Figure 5 General strategies of sensing by water-soluble polyfluorenes

3 水溶性聚芴衍生物的生物应用

3.1 化学/生物小分子检测

2004 年,Pei 小组^[16]报道了一种带咪唑功能团的聚芴在 THF 溶液中可以实现对 Cu^{2+} 的高选择性检

测。在此基础上,我们合成了侧链带咪唑功能团的阳离子聚苕 **PF-4**, 利用其对 Cu^{2+} 的络合能力设计了一种新的检测一氧化氮(NO)的体系^[17] (如图6所示)。该体系由三部分组成: 阳离子聚苕 **PF-4**、二价铜离子和 NO。 Cu^{2+} 通过 N-Cu 相互作用与聚苕结合, 通过光诱导的电子转移过程将聚苕的荧光淬灭。加入 NO 后, NO 将顺磁性的 Cu^{2+} 转变成抗磁性的 Cu^+ , Cu^+ 不能有效地淬灭聚苕, 荧光得到恢复。该体系具有很高的选择性, 其它几种与生物相关的氮化合物如 NOBF_4 、 NaNO_2 和 NaNO_3 都不能使聚苕的荧光恢复。这种阳离子聚苕/ Cu^{2+} 的体系可作为高灵敏性和高选择性检测 NO 的平台。

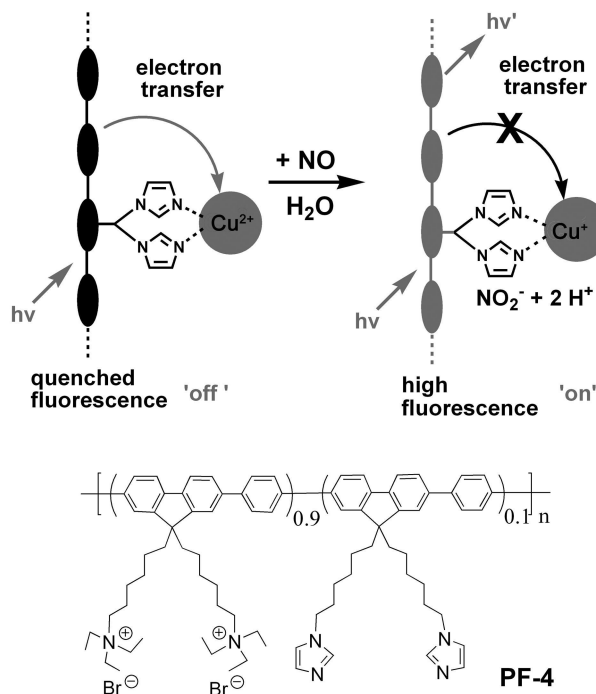


图6 基于水溶性聚苕衍生物的 NO 检测示意图

Figure 6 Schematic representation of the NO sensor based on the fluorescence turn-on of water-soluble polyfluorene **PF-4**

我们通过调控共轭聚合物体系的电子转移过程, 实现了对氮氧自由基以及抗氧化剂的灵敏检测^[18]。阳离子自由基淬灭剂 CAT1 可以高效率地淬灭阴离子聚合物 **PF-3** 的荧光。通过氢转移或氧化还原过程, CAT1 的顺磁性氮氧自由基转化成了无淬灭能力的反磁性羟胺, 从而 **PF-3** 的荧光得到恢复。该体系可以探测自由基的氢转移反应过程以及氧化还原的过程, 并且可以检测抗氧化剂的抗氧化能力。

我们通过合成侧链带有冠醚的水溶性聚苕衍生物, 利用双冠醚对于 Pb^{2+} 的特异络合作用, 实现了对 Pb^{2+} 的高选择性检测体系^[19]。最近, 我们还合成了一种水溶性苕和噻吩的共聚物, 这种聚合物聚集后会发生较强的自淬灭, 利用该聚合物的这一性质, 我们发展了草酸的检测体系^[20], 通过研究不同烷基链的有机二酸的研究, 发现体系对草酸具有高选择性。

利用阳离子水溶性聚苕的荧光放大效应我们设计发展了高灵敏度的 H_2O_2 和葡萄糖检测体系^[21]。检测体系由水溶性聚苕(**PF-2**)和硼酸酯保护的荧光素(F1-BB)组成。F1-BB 为电中性分子而且无荧光, 因此不能和聚合物发生作用, 加入 H_2O_2 后, F1-BB 的硼酸酯保护基被脱除产生带有负电荷而且发荧光的荧光素。聚合物和荧光素通过静电相互作用拉近距离从而发生荧光共振能量转移, 聚合物的荧光被淬灭。该体系具有较高的灵敏度, H_2O_2 的检测限可达到 15nM 。另外由于葡萄糖在葡萄糖氧化酶的作用下会产生 H_2O_2 , 所以该体系还可以间接实现对葡萄糖的检测, 检测限可达到 $10\mu\text{M}$ 。通过将水溶性聚苕的侧链共价连接上硼酸酯保护的荧光素分子合成得到了新型的水溶性聚苕衍生物 PF-FB (如图7所示)^[22]。利用加入 H_2O_2 后硼酸酯保护基被脱除然后发生从聚苕到荧光素的能量转移的原理可实现对 H_2O_2 的检测以及间接实现对葡萄糖的检测。结果表明, 通过共价连接的方法消除了离子强度对体系的

影响, 可以实现在血清中对 H_2O_2 和葡萄糖的高选择性和高灵敏度检测。

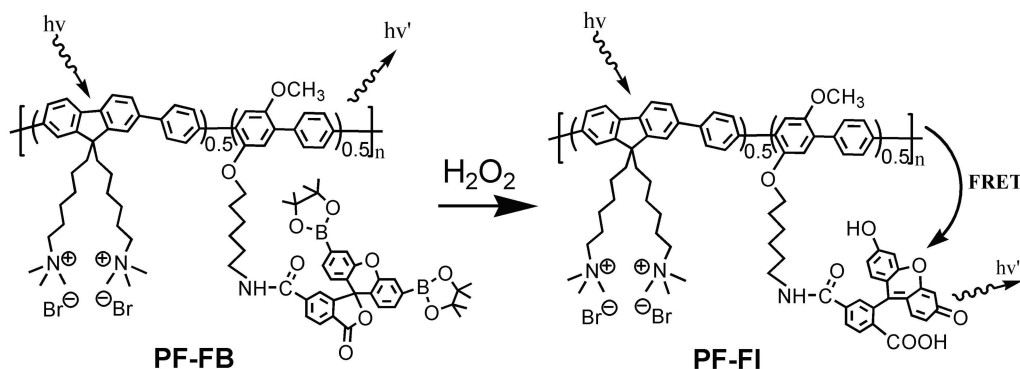


图 7 基于水溶性聚芳衍生物的 H_2O_2 检测示意图

Figure 7 Schematic representation of the H_2O_2 assays using water-soluble polyfluorene PF-FB

3.2 核酸检测

Gaylord 等^[23]首次提出了以荧光素标记的 PNA (PNA-FI) 以及阳离子聚芳 (PF-1) 为探针检测 DNA 的方法 (如图 8 所示)。PF-1 和荧光素的选择符合 Förster 荧光共振能量转移 (FRET) 的光学要求, 即 PF-1 的发射光谱与荧光素的吸收光谱有较好的重叠。首先, 在溶液中加入 PF-1 和 PNA-FI 探针, 由于 PNA-FI 不带电荷, 所以不存在 PF-1 与 PNA-FI 之间的静电相互作用, PF-1 与荧光素距离较远而不能产生有效的 FRET。向上述溶液中加入 ssDNA, 有以下两种情况发生: 情况 A 对应于加入完全配对的 ssDNA, 它随即与探针 PNA 杂化得到双螺旋 ssDNA/PNA-FI, PF-1 通过静电相互作用与之形成复合物 PF-1/ssDNA/PNA-FI, PF-1 与荧光素之间距离缩短, 发生有效的 FRET, 荧光素发射强的荧光。当加入不配对的 ssDNA (情况 B) 时, ssDNA 与 PNA 不能杂化, 仅在 PF-1 和 ssDNA 之间存在静电相互作用, 因此 PF-1 与荧光素之间 FRET 距离仍会较长而不能有效地传递能量, 荧光素不发射荧光。PNA/DNA 间的杂化因此可用增强的荧光素荧光发射强度来测量。在完全配对的 ssDNA 目标分子存在下, 荧光素的荧光发射强度是直接激发荧光素产生的荧光强度的 25 倍, 这表明荧光素发射的增强是聚合物 PF-1 的光学信号放大效应引起的, 该方法的检测限为 10 pM。

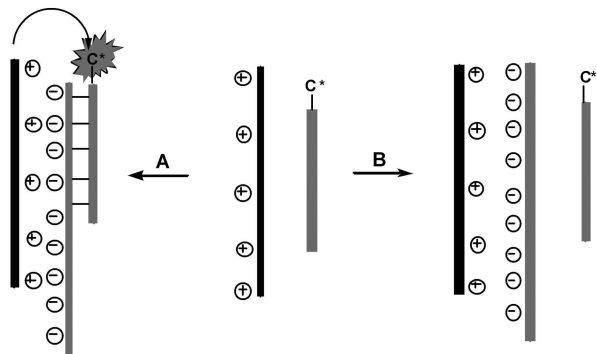


图 8 基于阳离子聚芳 PF-1 与 PNA 探针的 DNA 检测原理图

Figure 8 Schematic representation of DNA assays using water-soluble polyfluorene PF-1 and fluorescein-labeled PNA as probes

富含鸟嘌呤(G)碱基的端粒 ssDNA 在一定条件下可以通过分子间氢键相互作用形成特殊的 G-四链体结构, 这种 G-四链体 DNA 在细胞衰老, 凋亡以及癌细胞生长过程中起着及其重要的作用。利用共轭聚合物的荧光信号放大效应, 我们通过调节聚合物 PF-2 与标记染料(荧光素)的距离以及能量转移效率, 发展了一种用于高灵敏度检测这种构型转变的新技术 (如图 9 a-b 所示)^[24]。由于钾离子和凝血酶可以特异性的诱导 G-四链体的形成, 所以 G-DNA/PF-2 还可以用于高灵敏度和高选择性的钾离子和凝血酶

识别与传感体系。我们进一步研究了端粒 DNA 在配对单螺旋 DNA 存在下从 G 四链体到双螺旋构象的转化过程^[25]。该检测体系包括三元素:阳离子聚芳 **PF-2**、DNA 嵌入剂(溴乙啶)、末端荧光素标记的 G 四链体 DNA。工作原理是双螺旋 DNA 嵌入剂(溴乙啶)不与 G 四链体 DNA 作用,这种情况下只能发生从 **PF-2** 到荧光素的能量转移(FRET),溴乙啶不发出荧光;加入配对单螺旋 DNA 后,发生从 G 四链体到双螺旋构象的转化,溴乙啶嵌入到双螺旋 DNA,这种情况下可发生从 **PF-2** 到荧光素、再从荧光素到溴乙啶的双重能量转移(FRET),通过监测溴乙啶分子荧光信号的变化实现了端粒 DNA 从 G 四链体到双螺旋构象转化的高灵敏检测(如图 9c-d 所示)。

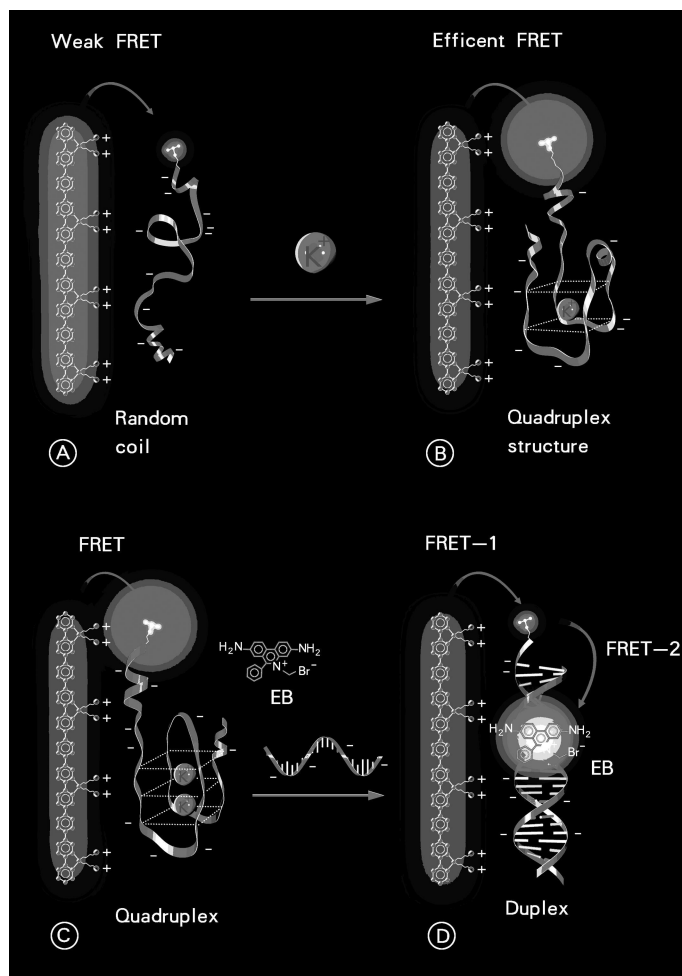
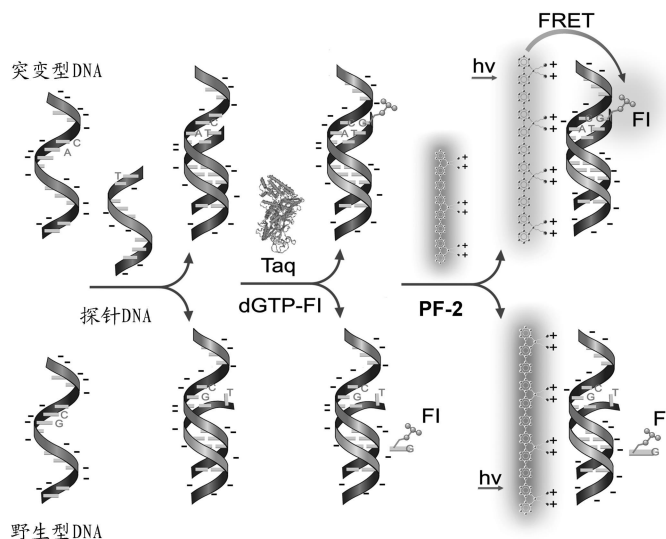


图9 基于阳离子聚芳 **PF-2** 的 DNA 构向转变检测原理图

Figure 9 Schematic representation of the assay for G-quadruplex DNA conformation transitions using water-soluble polyfluorene **PF-2**

基因组 DNA 中单核苷酸多态性位点的分析和测定在遗传病诊断、药物设计以及基因联合研究等方面具有重要意义。2007 年我们构建了阳离子共轭聚合物 **PF-2**/DNA 自组装体系,利用荧光共振能量转移技术以及等位特异性引物延伸反应,实现了高灵敏度、高选择性单核苷酸多态性检测^[26]。其基本原理如图 10 所示,当靶 DNA 与寡核苷酸探针在单核苷酸多态性位点完全匹配时,在 DNA 聚合酶的作用下,荧光素标记的核苷酸就会结合到探针上,正电荷的共轭聚合物 **PF-2** 与负电荷的 DNA 之间的强烈静电作用使荧光素分子靠近共轭聚合物,从而发生有效的荧光共振能量转移。通过监测水溶性共轭聚合物和荧光素的荧光发射强度变化就可以获得单核苷酸多态性位点的基因型信息。进一步优化引物延伸和荧光共振能量转移条件,分析了 76 例中国人基因组样本,所有检测结果均与 DNA 测序结果一致^[27]。该方法既利用单碱基引物延伸反应具有特异性的优势,又利用共轭聚合物具有放大荧光传感信号所产生的高敏感性的独特优点,大幅提高了 SNP 基因型分辨的特异性和敏感性。

图 10 基于阳离子聚芳 **PF-2** 的 DNA SNP 检测原理图Figure 10 Schematic representation of the SNP assays using water-soluble polyfluorene **PF-2**

与抑癌基因启动子区 CpG 岛的异常甲基化相关的抑癌基因失活, 是癌症发生的一个重要机制。一些基因的过甲基化有可能成为肿瘤乃至癌细胞形成的标志物。2008 年我们发展了基于阳离子聚芳 **PF-2** 的 DNA 甲基化检测新方法^[28]。结合单碱基延伸反应(SBE)的高特异性和共轭聚合物的光学信号放大性能, 高灵敏检测了质粒和人直结肠癌细胞的特异 CpG 位点的甲基化状态。最近我们利用该技术分析了五种肿瘤细胞的三个基因启动子的甲基化状态, 发现 *pl6*、*HPP1* 和 *GALR2* 三种基因可作为直结肠癌的候选标志物^[29]。该方法灵敏度高、成本低、简单设备即可满足要求, 这些优点使检测体系有望用于早期癌症诊断和预后跟踪。

3.3 蛋白质检测

我们通过调控阴离子聚芳 **PF-3** 荧光猝灭-恢复的可逆过程, 实现了乙酰胆碱酯酶(AChE)的高灵敏检测以及酶抑制剂的筛选^[30]。荧光猝灭基团 dabcy1 修饰的阳离子乙酰胆碱(ACh-dabcy1)通过静电相互作用与阴离子聚芳形成复合物, 导致聚合物荧光高效猝灭。AChE 催化 ACh-dabcy1 水解, dabcy1 基团发生电荷反转而远离复合物, 能量转移过程中断, 聚合物荧光恢复(如图 11 所示)。通过监测聚合物荧光信号变化, 实现了对 AChE 活性定量、实时地检测, 测定了酶动力学参数。通过酶抑制实验测定了酶抑制剂的 IC₅₀ 值, 为阿尔茨海默氏症(AD)的治疗提供了一个快速药物筛选的新方法。

我们还发展了基于水溶性阴离子聚芳 **PF-3** 的酶联反应荧光检测方法^[31]。利用阳离子酚类化合物与阴离子 **PF-3** 形成的静电复合物, 以荧光“turn-off”的方式实时检测了酪氨酸酶的活性。在氧气存在下, 酪氨酸酶催化氧化酚类底物产生醌, 醌通过电子转移过程高效猝灭聚合物的荧光, 从而实现酪氨酸酶的灵敏检测。该方法可用于酪氨酸酶抑制剂筛选, 并可扩展到其它酶促反应检测。将上述阳离子酚与半乳糖共价连接, 作为 β -半乳糖苷酶的底物, 与阴离子聚芳形成静电复合物, 通过酪氨酸酶偶联反应, 成功实现了 β -半乳糖苷酶活性的实时检测。本方法不但避免了对酶底物分子的荧光标记, 而且高效荧光猝灭效应极大地提高了检测灵敏度。

2007 年我们制备了荧光素标记的 DNA(DNA-FI)与阳离子聚芳 **PF-2** 的静电复合物, 通过测定聚芳和荧光素之间的荧光共振能量转移(FRET)信号, 实现了对限制性及非限制性核酸内切酶的灵敏检测(如图 12 所示)^[32]。其中核酸酶 S1 的检测限(LOD)非常低, 与目前报道的最灵敏的检测方法处于同一数量级。根据甲基化的 DNA 抑制限制性内切酶活性的原理, 利用 DNA-FI 与阳离子聚芳的静电复合物, 成功实现了对 DNA 甲基化转移酶活性的灵敏分析。

我们通过合成阳离子和阴离子的聚芳并苯并噻二唑衍生物(**PF-5** 与 **PF-6**)设计了碱性磷酸酶和胰蛋

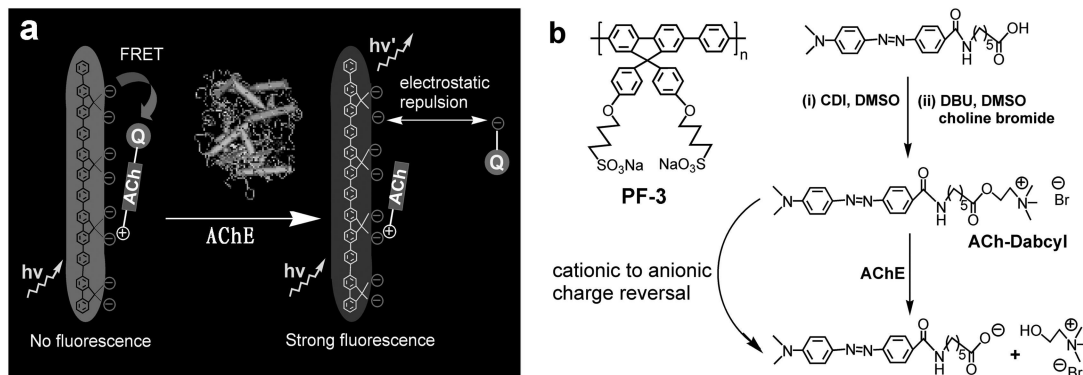


图 11 (a) 基于阴离子聚芳 **PF-3** 的乙酰胆碱酯酶的检测体系示意图. (b) 阴离子聚芳 **PF-3** 的结构式以及酶底物的合成路线

Figure 11 (a) Schematic representation of activity assays of AChE. (b) Chemical structure of anionic conjugated polymer (**PF-3**) and the synthesis of cationic ACh-DabcyI

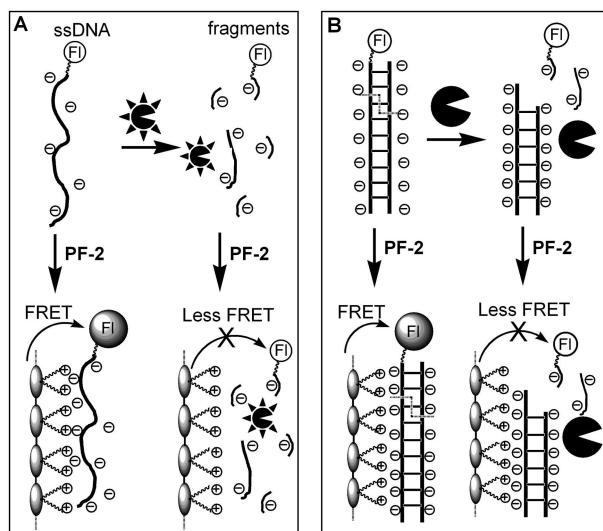


图 12 核酸酶和 DNA 甲基化酶的检测体系示意图

Figure 12 Schematic representation of nuclease assays using cationic polyfluorene **PF-2**

白酶的可视检测体系(如图 13 所示)^[33]。首先加入带有相反电荷的底物和聚合物发生静电相互作用诱导聚合物发生聚集,从而导致聚合物发生分子间的能量转移,溶液的颜色发生变化;而加入特异性的酶后,底物被酶切除成为带有电荷的小片断,聚集被破坏,溶液的颜色恢复。通过检测荧光或溶液颜色的变化实现了对碱性磷酸酶和胰蛋白酶的特异性检测。

3.4 基于逻辑信号的多重检测体系

我们通过构建阳离子聚芳 **PF-2**/DNA 自组装体系,利用不同的化学输入控制能量转移过程,调控荧光输出信号,实现了 YES、NOT、AND、NAND、INH、INHIBIT 以及 XNOR 的多逻辑门功能^[34]。我们构建了阳离子聚芳 **PF-2**/三种染料标记 Y 型 DNA 复合体系,通过调控该体系的多重能量转移过程,调控聚芳以及荧光染料的荧光逻辑输出信号,实现了三种核酸酶的同时检测,为多种物质的同时检测提供了新思路(如图 14 所示)^[35]。

4 展望

基于水溶性共轭聚合物的 DNA 甲基化分析仍然有很大的研究空间,比如荧光标记物的彻底免除、PCR 非特异性扩增干扰的根除、实时或定量检测的实现、更具体的癌症类型-基因甲基化关联、去甲基化

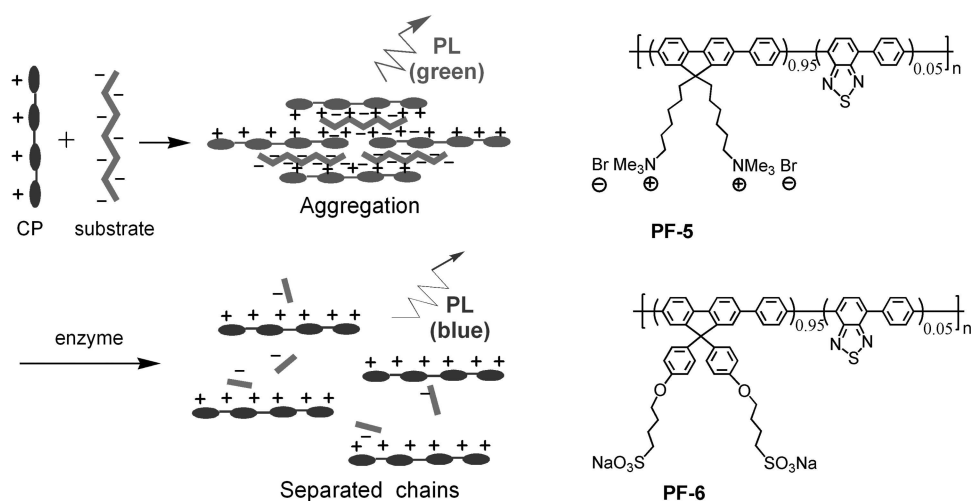


图 13 碱性磷酸酶和胰蛋白酶的可视检测体系示意图

Figure 13 Schematic representation of the assay for enzymes and the cleavages of charged substrates

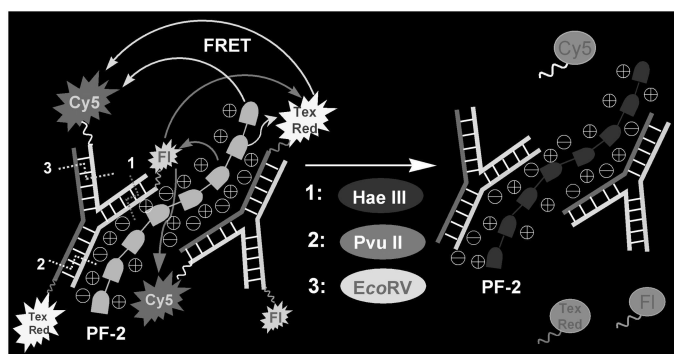


图 14 三种核酸酶同时检测原理图

Figure 14 Schematic representation of the multiplex detection of nucleases

药物的筛选、CpG 甲基化酶活性的灵敏检测等等。此外, 将甲基化分析发展到高通量的芯片上将是一个使检测技术真正商品化的必经之路。基于水溶性共轭聚合物设计的 DNA 阵列或芯片技术已日臻成熟, 但蛋白质阵列或芯片技术却非常少见。因此, 基于高选择性响应的蛋白质阵列或芯片技术的研究应该受到研究者的重视, 目标是一些疾病相关的蛋白质标志物作用时能够特异性地出现响应信号。另外, 目前基于水溶性共轭聚合物探针的生物分子的体外检测已经开展较多, 但对细菌、细胞等生物体及组织的原位检测方面的工作研究较少^[36, 37]。总之, 目前基于水溶性共轭聚合物探针的核酸检测已经取得了丰硕的成果, 并且这些研究对真正实现疾病的早期诊断更近了一步。当然距离临床实际应用还有很多问题需要解决, 进一步需要研究聚合物生物传感的机理、寻找高效的荧光能量转移体系, 利用共轭聚合物为探针从多角度深入研究基因水平上的生命反应过程, 这将为基因组学研究、疾病诊断、基因突变的检测等创造一个更为便利的研究平台^[38]。

参考文献:

- [1] Thomas S W, Joly G D, Swager T M. Chem Rev, 2007, 107: 1339.
- [2] Liu B, Bazan G C. Chem Mater, 2004, 16: 4467.
- [3] Duan X R, Liu L B, Feng F D, Wang S. Acc Chem Res, 2010, 43: 260.
- [4] Bunz U H F, Rotello V M. Angew Chem Int Ed, 2010, 49: 3268.
- [5] Ho H A, Najari A, Leclerc M. Acc Chem Res, 2008, 41: 168.
- [6] Zhou Q, Swager T M. J Am Chem Soc, 1995, 117: 12593.
- [7] Chen L, McBrach D W, Wang H L, Helgeson R, Wudl F, Whitten D G. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96: 12287.

- [8] Pinto M R, Schanze K S. *Synthesis*, 2002, 1293.
- [9] McQuade D T, Pullen A E, Swager T M. *Chem Rev*, 2000, 100: 2537.
- [10] Scherf U E, List J W. *Adv Mater*, 2002, 14: 477.
- [11] Stork M, Gaylord B S, Heeger A J, Bazan G C. *Adv Mater*, 2002, 14: 361.
- [12] Liu B, Wang S, Bazan G C, Mikhailovsky A. *J Am Chem Soc*, 2003, 125: 13306.
- [13] Burrows H D, Lobo V M M, Pina J, Ramos M L, de Melo J S, Valente A J M, Tapia M J, Pradhan S, Scherf U. *Macromolecules*, 2004, 37: 7425.
- [14] Wang S, Liu B, Gaylord B S, Bazan G C. *Adv Funct Mater*, 2003, 13: 463.
- [15] Feng F, He F, An L, Wang S, Li Y, Zhu D. *Adv Mater*, 2008, 20: 2959.
- [16] Zhou X H, Yan J C, Pei J. *Macromolecules*, 2004, 37: 7078.
- [17] Xing C, Yu M, Wang S, Z Shi, Li Y, Zhu D. *Macromol Rapid Commun*, 2007, 28: 241.
- [18] Tang Y, He F, Yu M, Wang S, Li Y, Zhu D. *Chem Mater*, 2006, 18: 3605.
- [19] Yu M, He F, Tang Y, Wang S, Li Y, Zhu D. *Macromol Rapid Commun*, 2007, 28: 1333.
- [20] Sun H, Feng F, Yu M, Wang S. *Macromol Rapid Commun*, 2007, 28: 1905.
- [21] He F, Tang Y, Yu M, Wang S, Li Y, Zhu D. *Adv Funct Mater*, 2006, 16: 91.
- [22] He F, Feng F, Wang S, Li Y, Zhu D. *J Mater Chem*, 2007, 17: 3702.
- [23] Gaylord B S, Heeger A J, Bazan G C. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 10954.
- [24] He F, Tang Y, Wang S, Li Y, Zhu D. *J Am Chem Soc*, 2005, 127: 12343.
- [25] He F, Tang Y, Yu M, Feng F, An L, Sun H, Wang S, Li Y, Zhu D, Bazan G C. *J Am Chem Soc*, 2006, 128: 6764.
- [26] Duan X, Li Z, He F, Wang S. *J Am Chem Soc*, 2007, 129: 4154.
- [27] Duan X, Yue W, Liu L, Li Z, Li Y, He F, Zhu D, Zhou G, Wang S. *Nature Protoc*, 2009, 4: 984.
- [28] Feng F, Wang H, Han L, Wang S. *J Am Chem Soc*, 2008, 130: 11338.
- [29] Feng F, Liu L, Wang S. *Nature Protoc*, 2010, 5: 1255.
- [30] Feng F, Tang Y, Wang S, Li Y, Zhu D. *Angew Chem Int Ed*, 2007, 46: 7882.
- [31] Feng F, Liu L, Wang S. *Macromol Chem Phys*, 2009, 210: 1188.
- [32] Feng F, Tang Y, He F, Yu M, Duan X, Wang S, Li Y, Zhu D. *Adv Mater*, 2007, 19: 3490.
- [33] An L, Tang Y, Feng F, He F, Wang S. *J Mater Chem*, 2007, 17: 4147.
- [34] Tang Y, He F, Wang S, Li Y, Zhu D, Bazan G C. *Adv Mater*, 2006, 18: 2105.
- [35] Feng X, Duan X, Liu L, Feng F, Wang S, Li Y, Zhu D. *Angew Chem Int Ed*, 2009, 48: 5316.
- [36] Phillips R L, Miranda O R, You C C, Rotello V M, Bunz U H F. *Angew Chem Int Ed*, 2008, 47: 2590.
- [37] You C C, Miranda O R, Gider B, Ghosh P S, Kim I B, Erdogan B, Krovci S A, Bunz U H F, Rotello V M. *Nat Nanotechnol*, 2007, 2: 318.
- [38] Feng X, Liu L, Zhu D, Wang S. *Chem Soc Rev*, 2010, 39: 2411.

Water-Soluble Polyfluorenes: Synthesis, Property and Biosensing Applications

WANG Shu^{*}

(Key Laboratory of Organic Solids, Institute of Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China)

Abstract: Conjugated polymers have a strong ability to capture light, which can be used to amplify the fluorescence signal and greatly improve the detection sensitivity. Conjugated polymer-based biosensing systems have important applications in understanding the information transfer in biological systems, especially in the early diagnosis of disease. Because of good chemical and thermal stabilities, high fluorescence quantum yield and easy modification, in recent years, water-soluble polyfluorene derivatives have been widely used in the field of biosensing. In this review, the design, synthesis and properties of water-soluble polyfluorene derivatives and their applications in sensitive biological detection are introduced, and finally future trends in this area are discussed.

Key words: Water-soluble polyfluorenes; Design and synthesis; Optical properties; Biological detections