

生物素功能化水溶性共轭聚合物的合成、表征及其生物分析应用

刘兴奋^{*,a} 蔡小慧^a 黄艳琴^a 石琳^a 范曲立^a 黄维^{a,b}

(^a 有机电子与信息显示国家重点实验室培育基地 南京邮电大学信息材料与纳米技术研究院 南京 210023)

(^b 江苏-新加坡有机电子和信息显示联合实验室 南京工业大学先进材料研究院 南京 211816)

摘要 以四(三苯基膦)钯/碘化亚铜为催化剂,利用 Sonogashira 偶联反应,合成了一种主链含芴炔苯结构的侧链生物素(biotin)修饰的具有蓝光发射特性的水溶性共轭聚合物(PFPNBr-biotin). 其结构通过核磁共振和红外光谱进行表征;分子量(分布)利用凝胶渗透色谱进行表征. 研究了该聚合物在不同溶剂、不同浓度及不同 pH 环境中的光物理性质变化. 与未功能化的共轭聚合物相比,这种生物素功能化的聚合物对亲和素蛋白显示出较高的选择性. 目前,生物素-亲和素系统已在生物分析领域广泛使用,因此,该聚合物在生物分子的特异性检测、荧光标记、细胞及分子成像等领域具有较好的应用前景.

关键词 生物素; 水溶性共轭聚合物; 生物功能化; 生物分析

Biotinylated Water-Soluble Conjugated Polymers: Synthesis and the Application in Biological Analysis

Liu, Xingfen^{*,a} Cai, Xiaohui^a Huang, Yanqin^a Shi, Lin^a Fan, Quli^a Huang, Wei^{a,b}

(^a Key Laboratory for Organic Electronics & Information Displays (KLOEID) and Institute of Advanced Materials (IAM), Nanjing University of Posts and Telecommunications, Nanjing 210023)

(^b Jiangsu-Singapore Joint Research Center for Organic/Bio-Electronics & Information Displays and Institute of Advanced Materials, Nanjing Tech University, Nanjing 211816)

Abstract Conjugated polymers with good photostability, high absorption coefficients and quantum yields have attracted great interest in biological analysis, molecular electronics and organic electronics. Biofunctional conjugated polymers have many advantages in bioanalysis, such as high selectivity and excellent tumor targeting capacity. Herein, a biotinylated water-soluble conjugated polyfluorene derivative (PFPNBr-biotin) with blue fluorescence emission characteristic was synthesized via Sonogashira coupling reaction by using Pd(PPh₃)₄/CuI as catalysts. The molecular structure of compounds, neutral polymer and cationic polymer were characterized by nuclear magnetic resonance (NMR) and Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR); molecule weight and distribution of polymers were characterized by gel permeation chromatography (GPC) and other methods. The photophysical properties of the PFPNBr-biotin in mixed solvent systems with different ratio of methanol to water were studied by monitoring its fluorescence spectra. The results demonstrate an increased fluorescence intensity of PFPNBr-biotin with the increase of methanol. Changes in the photophysical properties of PFPNBr-biotin with the increasing polymer concentration were investigated by measuring UV-vis absorbance and fluorescence spectra. Some aggregates may form when the concentration of polymer is more than 400 μmol·L⁻¹, which corresponding to decreased UV-vis absorbance and fluorescence emission. Optical properties of PFPNBr-biotin itself and the protein detection with PFPNBr-biotin in solutions of different pHs were studied to analyze the aggregation behavior before and after interacting with protein. Compared to the nonfunctional conjugated polymer, PFPNBr-biotin shows excellent selectivity to avidin over negative proteins such as lysozyme (Lys), immunoglobulin G (IgG), hemoglobin (Hb) and bovine serum albumin (BSA). So it can be used to distinguish avidin (or streptavidin) over many proteins just by monitoring the fluorescence change of PFPNBr-biotin. Considering the fact that biotin-avidin system has been widely used in biological analysis, we believe that this biotinylated water-soluble conjugated polymer has a potential application in detecting and labeling of biomolecules and fluorescence imaging of tumor cells.

Keywords biotin; water-soluble conjugated polymers; biofunctionalization; bioanalysis

* E-mail: iamxfliu@njupt.edu.cn; Tel.: 025-85866396; Fax: 025-85866396.

Received December 20, 2013; published February 14, 2014.

Supporting information for this article is available free of charge via the Internet at <http://sioc-journal.cn>.

Project supported by the National Basic Research Program of China (Nos. 2009CB930601, 2012CB933301, 2012CB723402), the National Natural Science Foundation of China (Nos. 21005040, 51073078, 51173080), the Ministry of Education of China (No. IRT1148), the Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions (PAPD) and the Program of Scientific Innovation Research of College Graduate in Jiangsu Province (CXLX12_0468).

项目受国家重点基础研究发展计划(Nos. 2009CB930601, 2012CB933301, 2012CB723402)、国家自然科学基金(Nos. 21005040, 51073078, 51173080)、“有机与生物光电子学”教育部创新团队(No. IRT1148)、江苏高校优势学科建设工程及江苏省普通高校研究生科研创新计划(No. CXLX12_0468)资助。

1 引言

近年来, 共轭聚合物由于具有优异的光、电性能而受到有机光/电子学和生物光/电子学领域研究者的高度关注. 非水溶性的共轭聚合物常被用于新一代光电器件^[1~4]和太阳能电池^[5,6]的研制. 水溶性共轭聚合物由于良好的生物相容性和优异的光学性质被作为传感材料和高灵敏度荧光探针用于化学/生物传感、生物成像、疾病诊断及治疗等领域^[7~12]. 目前, 已研究报道的用于生物分析领域的水溶性共轭聚合物包括聚苯撑乙炔(PPE)、聚芴(PF)、聚芴苯(PFP)、聚噻吩(PT)、聚苯撑乙烯(PPV)和聚苯撑(PPP)等^[7,9,10,13,14]. 然而, 这些聚合物大多不含特殊功能基团, 其对生物分子的检测主要通过聚合物与生物分子(如蛋白质、氨基酸和 DNA)之间的静电相互作用、疏水作用和氢键等弱相互作用来实现. 因此, 存在着特异性较低、背景信号较强等问题. 相对而言, 生物功能化的水溶性共轭聚合物, 则可以通过受体-配体之间的特异性反应来提高生物分子检测的选择性和成像分析的靶向性. 目前, 已报道的水溶性共轭聚合物的功能化基团主要为糖基^[15]、羧基^[16,17]和氨基^[18,19], 侧链修饰生物素^[20]、氨基酸^[21]、肽段^[22]、核酸^[23]或抗

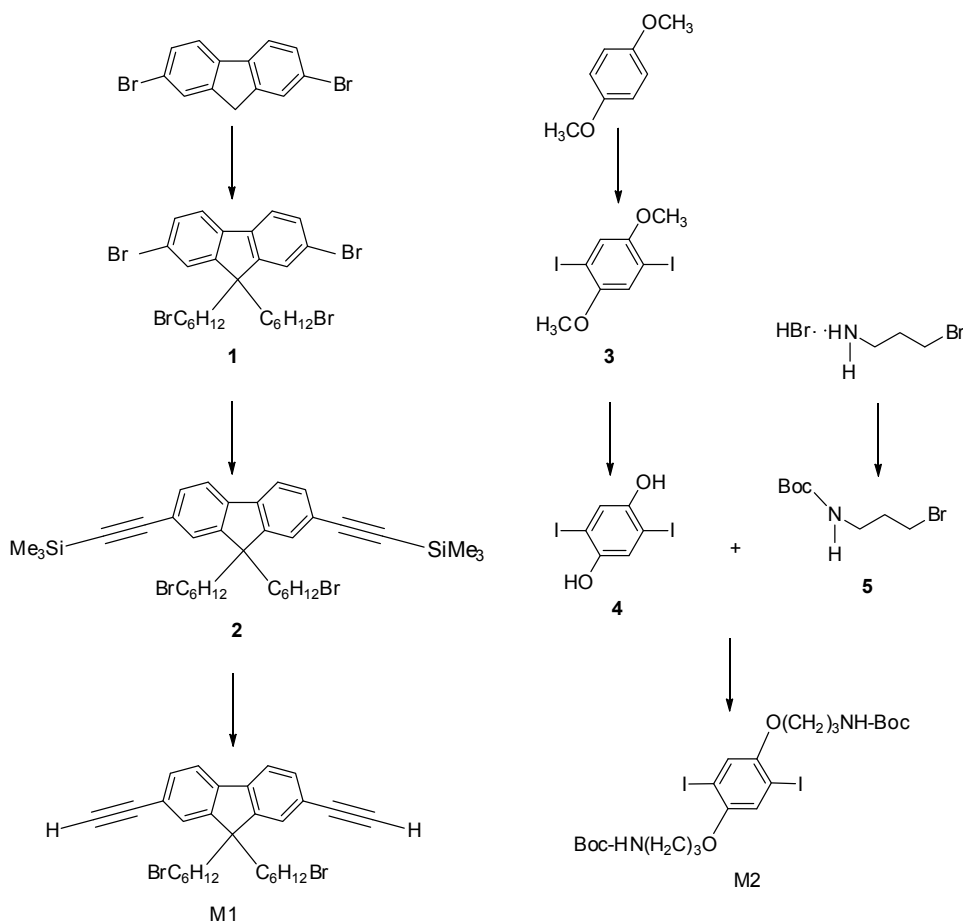
体^[24]等生物分子的功能化共轭聚合物还比较少^[25].

本工作以具有强荧光发射特性的芴单元为基础, 设计合成了一种主链含芴炔苯单元, 侧链修饰生物素(biotin)的水溶性共轭聚合物. 对其结构及光物理性能进行了表征和分析, 探索了其在生物传感领域特别是蛋白质检测方面的应用.

2 结果与讨论

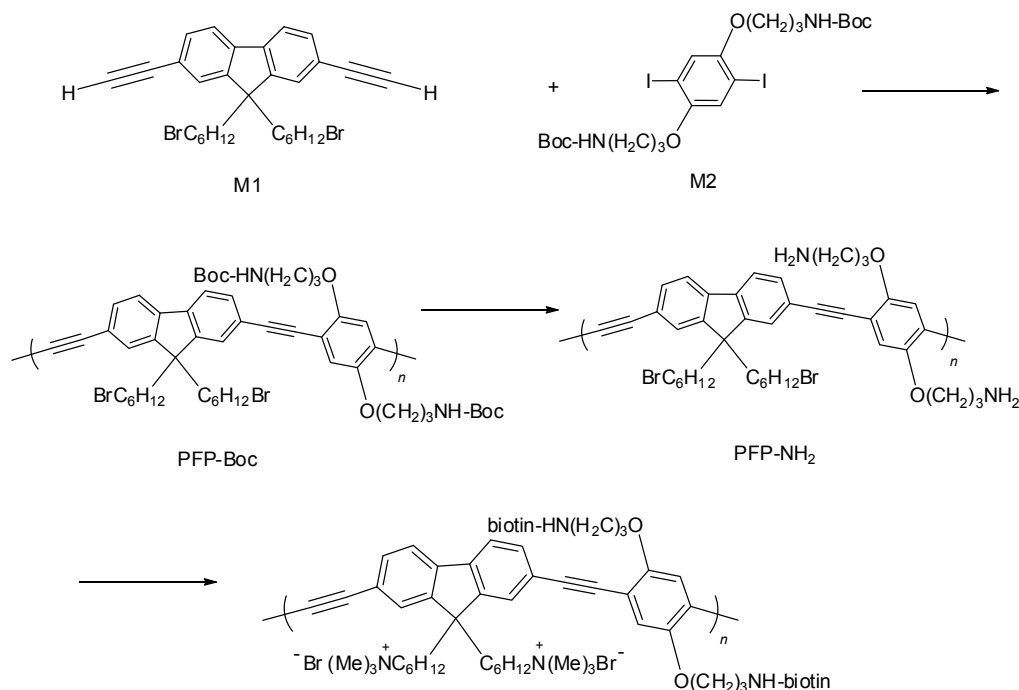
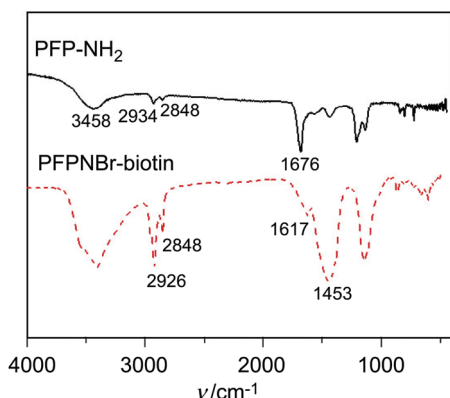
2.1 结构表征与分析

化合物 **1**~**5**、单体 **M1** 和 **M2**、聚合物 PFP-Boc, PFP-NH₂ 和 PFPNBr-biotin 的合成路线见图式 1, 2, 核磁分析数据见第 4.1 和 4.2 节. 所用试剂及仪器测试条件等见 supporting information. 聚合物 PFP-NH₂ 和 PFPNBr-biotin 由于在氘代试剂中溶解度较低, 其氢谱峰位很难得到. 因此, 我们通过红外光谱对其侧链的 NH₂ 和 biotin 进行了表征. 如图 1 所示, PFP-NH₂ 的红外光谱中, Boc 中的叔丁基在 1367 cm⁻¹ 处的特征峰消失, 出现的 1676 cm⁻¹ 左右的峰为伯胺面内的弯曲振动, 这些特征峰符合 PFP-Boc 的主要官能团; 而 PFPNBr-biotin 的红



图式 1 单体 M1 和 M2 的合成路线图

Scheme 1 Synthesis process of monomers M1 and M2

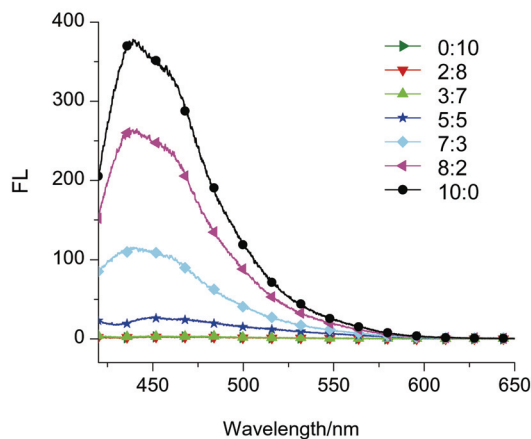
图式 2 聚合物 PFP-Boc, PFP-NH₂ 和 PFPNBr-biotin 的合成路线图Scheme 2 Synthesis process of polymers PFP-Boc, PFP-NH₂ and PFPNBr-biotin图 1 聚合物 PFP-NH₂ 和 PFPNBr-biotin 的红外光谱Figure 1 FT-IR spectra of PFP-NH₂ and PFPNBr-biotin

外光谱中 2926 和 2848 cm^{-1} 处为 CH 和 CH_2 的伸缩振动, 1617 cm^{-1} 为新生成的酰胺键中氨基的特征峰, 1453 cm^{-1} 为新生成的酰胺键的伸缩振动. 这些特征吸收峰表明, PFP-NH₂ 和生物素之间通过 PFP-NH₂ 的 NH_2 和生物素的 COOH 形成的酰胺键而连接在一起.

2.2 溶剂对聚合物光物理性质的影响

聚合物 PFPNBr-biotin 在不同比例的甲醇/水混合溶剂中的荧光光谱如图 2 所示. 甲醇/水体积比分别为 10:0, 8:2, 7:3, 5:5, 3:7, 2:8 和 0:10. 由图可见, PFPNBr-biotin 的荧光强度随着混合溶剂中甲醇含量的增加而增强. 当甲醇/水的体积比大于 5:5 时, 该聚合物的荧光较强. 当甲醇/水的体积比小于 5:5 时, 聚合物的荧光强度很弱. 原因是该聚合物在甲醇中的溶解度

比其在水中的溶解度高. 随着混合溶剂中甲醇含量的增加, 聚合物在溶剂中的溶解性增强, 聚合物自身形成的聚集体数量减少, 由此引起的自猝灭较小, 故其荧光较强且呈逐渐增加的趋势. 而当体系中甲醇含量较低时, 聚合物在混合溶剂中的溶解度有限, 会形成一定量的聚集体, 因而荧光很弱.

图 2 不同体积比的甲醇/水对 PFPNBr-biotin ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 荧光的影响Figure 2 Fluorescence spectra of PFPNBr-biotin ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) in solvents with different ratios of MeOH to H_2O

2.3 浓度对聚合物光物理性质的影响

不同浓度 PFPNBr-biotin 在甲醇/水体积比为 4:1 的混合溶剂中的紫外-可见吸收和荧光发射光谱如图 3 所示. 由图可见, 随着聚合物浓度从 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 逐渐

增至 $400 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 其紫外-可见吸收及荧光发射强度都相应增强. 当其浓度增至 $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 其紫外-可见吸收及荧光强度反而降低. 原因可能是当浓度高于 $400 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 随着浓度的增加, 聚合物产生聚集现象, 导致一定程度的自猝灭.

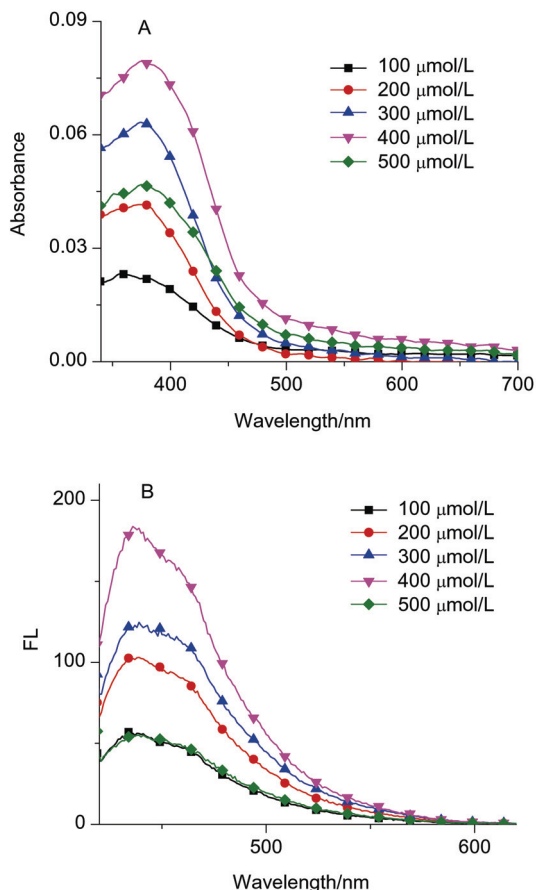


图3 聚合物 PFPNBr-biotin 的紫外可见吸收(A)和荧光发射(B)随浓度的变化

Figure 3 Responses of UV-visible absorbance (A) and fluorescence emission (B) to the concentration of PFPNBr-biotin

2.4 pH 对聚合物光物理性质的影响

阴、阳离子之间的静电作用是离子型水溶性共轭聚合物与物质之间作用的重要基础. 为了研究 PFPNBr-biotin 在不同 pH 体系中光物理性质的变化, 我们将 PFPNBr-biotin 溶解在甲醇/水体积比为 4:1 的混合溶剂中, 研究其荧光强度随体系 pH 值的变化. 如图 4 所示, 在 pH 5 和 pH 9 时其荧光强度出现两个峰值, 在 pH 7 时达到最低值. 我们推测 pH 为 5 时, 溶液中质子与 PFPNBr-biotin 侧链的阳离子间的静电斥力最大, 使得聚合物间的距离较大, 减少了因聚合物聚集产生的荧光自猝灭现象, 从而使荧光强度最大. 在 pH 7 时, 生物素中的 NH 及酰胺键倾向于形成氢键而聚集, 而且聚集程度较大, 会引起较强的自猝灭, 因而其荧光强度降至最低值. 在 pH 9 时, 尽管体系中的 OH^- 与聚合物侧链的阳离子间有一定的静电作用, 可以形成一定量的聚集体,

但由于氢键作用引起的聚集体不断被破坏, 从而使得聚合物荧光增强. 在 pH 9~12 范围内, 随着 pH 的增大, 体系中的 OH^- 增多, 与聚合物之间的静电作用增强, 形成的聚集体也增多, 由此引起的自猝灭增强, 因而荧光强度呈逐渐降低的趋势.

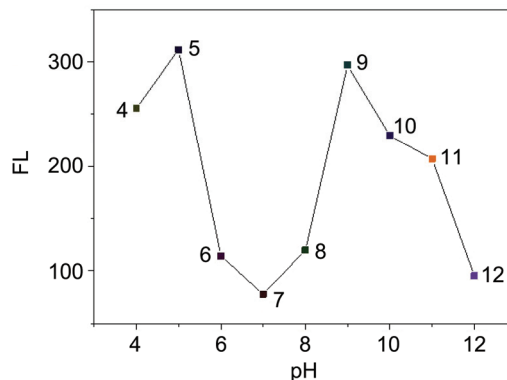


图4 聚合物 PFPNBr-biotin ($100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 的荧光随体系 pH 值的变化

Figure 4 Fluorescence strength of PFPNBr-biotin ($100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) in buffers with different pHs

2.5 生物传感检测

正如我们所知, 生物素可以与链霉亲和素 (streptavidin, SA) 或亲和素 (avidin) 进行高度特异性结合. 因此, 生物素修饰的水溶性共轭聚合物可以用于链霉亲和素蛋白的特异性检测. 如图 5 所示, 作为空白对照的 PFPNBr-biotin 溶液具有较强的荧光, 当向其中加入各种蛋白时, 其荧光强度变化各异. 在 pH 5 的体系中, SA 的加入会使聚合物的荧光有所增强, 而对照蛋白溶菌酶 (Lys)、免疫球蛋白 (IgG)、血红蛋白 (Hb) 和牛血清蛋白 (BSA) 的加入也会使其荧光略有升高或降低, 因此不能区分 SA 和其它蛋白. 在 pH 7 的体系中, SA 的加入会使聚合物的荧光强度大幅度降低 (猝灭效率 76%), 而对照蛋白对其荧光的猝灭很小 (猝灭效率 0~12%), 因此可显著区分 SA 和其它蛋白, 实现对 SA 的特异性检测. 在 pH 9 的体系中, PFPNBr-biotin 对 SA 的区分程度不是很显著, 但仍具有一定的特异性. 作者认为, PFPNBr-biotin 在不同 pH 体系中表现出对 SA 特异性识别能力的不同可能与其等电点及聚合物与蛋白在不同 pH 体系中的相互作用有关. 亲和素蛋白的等电点为 6.0, 在 pH 为 5 时其表面带正电荷, 与同样带正电荷的 PFPNBr-biotin 产生较大的静电斥力, 使得聚合物与 SA 的距离较大, 特异结合的较少, 荧光变化不显著; 在 pH 7 时, SA 带一定量的负电荷, 与正电荷的 PFPNBr-biotin 之间的静电作用较强, 从而可以使侧链的生物素与 SA 进行特异性结合, 引起聚合物聚集, 导致荧光猝灭; 在 pH 9 时, SA 带较强的负电荷, 大部分的 SA 与 PFPNBr-biotin 侧链的阳离子产生静电吸引, 从而使 SA 与 biotin 之间的结合减弱, 因此体系荧光猝灭的程度没有 pH 7 时大, 此时

PFPNBr-biotin 对 SA 的选择性没有 pH 7 时显著. 不同 pH 体系中检测蛋白的荧光光谱见附图 1. 为了验证上述分析, 我们研究了离子强度(NaCl 浓度)对蛋白质检测的影响, 结果如图 5B 和 5C 所示. 在 pH 7 的体系中, 当 NaCl 浓度为 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, SA 会使聚合物的荧光猝灭, 而 BSA 会使其荧光增强; 当 NaCl 浓度为 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, SA 的加入会使聚合物的荧光显著猝灭, 而对照蛋白

BSA 对其荧光几乎没有影响, 因此在两种条件下都能很好的识别靶蛋白. 在 pH 9 的体系中, 当 NaCl 浓度为 10 和 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时都不能特异性检测 SA. 进一步地, 我们在 pH 分别为 6 和 8 的体系中对蛋白进行了检测, 结果(附图 2)显示, 各种蛋白的加入会使聚合物的荧光不同程度的减低, 但是并没有显示出对 SA 的特异性. 可见, PFPNBr-biotin 在 pH 7 的体系中可实现对 SA 的特异性检测的确与其侧链的 biotin 有关. 该聚合物在不同 pH 体系中表现出不同的识别靶蛋白的能力与靶蛋白的等电点及蛋白和聚合物之间的静电作用有关.

3 结论

通过先聚合后功能化的方法合成了一种生物素化的水溶性共轭聚合物 PFPNBr-biotin. 研究表明, 其光物理性质对自身浓度、溶剂、溶液 pH 值均有一定的依赖性. 该聚合物对亲和素蛋白具有较好的选择性, 在生物传感、荧光标记、细胞成像等领域具有潜在的应用价值.

4 实验部分

4.1 单体的合成与表征

化合物及单体的合成路线如图式 1 所示. 其中, 化合物 1, 2 及单体 M1, M2 的合成在文献[26]基础上略有调整; 化合物 3 和 4 的合成按照文献[26]进行, 具体过程及表征数据请见支持信息.

2,7-二溴-9,9-二(6-溴己基)芴(1): 将 2,7-二溴芴(0.39 g, 1.2 mmol), 四丁基溴化铵(0.085 g, 0.24 mmol)和 1,6-二溴己烷(3.0 g, 12 mmol)加入 75 °C 的 50% 的氢氧化钾水溶液(30 g KOH)中. 15 min 后, 将反应混合物迅速冷至室温. 用二氯甲烷萃取三次, 合并有机层, 用 1 mol·L⁻¹ 盐酸溶液、水及食盐水分别洗涤一次, 用无水硫酸钠干燥. 过滤, 用旋转蒸发器减压脱溶, 过量的 1,6-二溴己烷用减压蒸馏除去, 残余物用硅胶柱层析提纯, 以石油醚为洗脱液. 减压脱溶后得到浅黄色晶体(0.47 g, 产率为 60.5%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.67 (s, 2H), 7.64 (d, *J*=8.0 Hz, 2H), 7.41 (d, *J*=8.0 Hz, 2H), 3.30 (t, *J*=6.4 Hz, 4H), 1.88~1.94 (m, 4H), 1.62~1.70 (m, 4H), 1.02~1.25 (m, 8H), 0.54~0.62 (m, 4H).

2,7-二[(三甲硅基)炔基]-9,9-二(6-溴己基)芴(2): 在氮气保护下, 将二氯双(三苯基膦)钯(189.3 mg, 0.27 mmol)和碘化亚铜(51.4 mg, 0.27 mmol)加入含 2,7-二溴-9,9-二(6-溴己基)芴(3.51 g, 5.4 mmol)的 30 mL 二异丙胺溶液中, 接着用注射器将三甲硅基乙炔(1.17 g, 11.9 mmol)注入此混合物中. 此混合液在氮气保护下回流 6 h. 冷至室温后, 用旋转蒸发器减压脱溶. 残余物用短硅胶柱层析提纯, 以石油醚为洗脱液. 减压脱溶后得到浅黄色粘液, 静置后得浅黄色晶体(2.78 g, 产率为 75.3%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.59 (d, *J*=7.6 Hz, 2H),

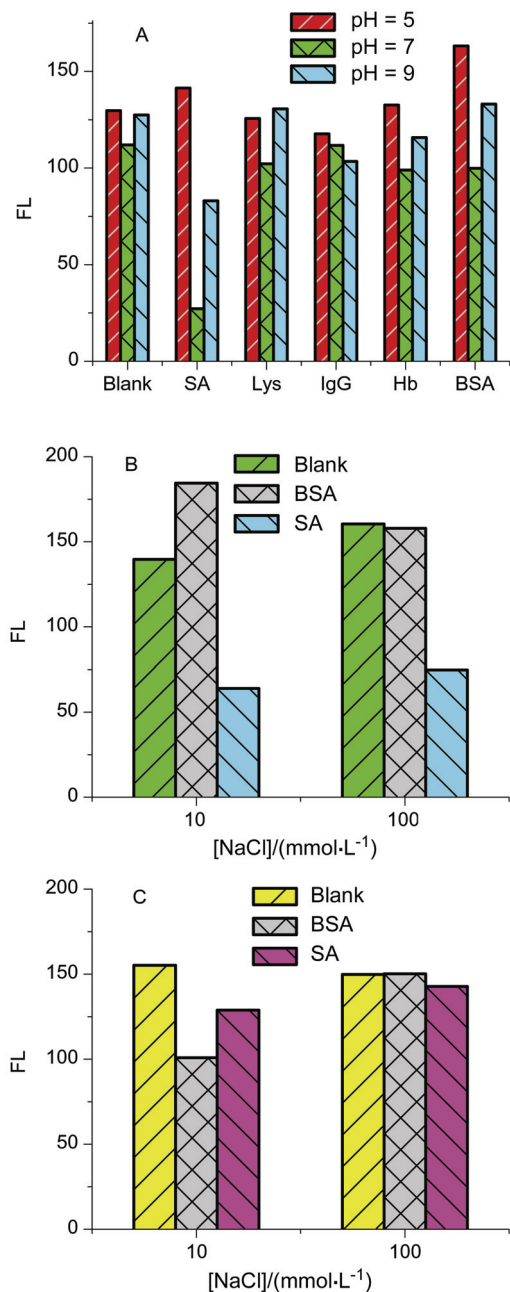


图 5 (A) pH 分别为 5, 7, 9 的体系中对蛋白的检测、(B) pH 为 7 时 NaCl 浓度对 SA 蛋白检测的影响和(C) pH 为 9 时 NaCl 浓度对 SA 蛋白检测的影响

Figure 5 Detection of proteins with PFPNBr-biotin in solutions with pHs 5, 7 and 9 (A), influence of NaCl concentration on protein detection in solution of pH 7 (B) and pH 9 (C)

7.45 (d, $J=7.4$ Hz, 2H), 7.40 (s, 2H), 3.28 (t, $J=10$ Hz, 4H), 1.92~1.96 (m, 4H), 1.62~1.69 (m, 4H), 1.02~1.21 (m, 8H), 0.52~0.60 (m, 4H), 0.27 (s, 18 H).

2,7-二炔-9,9-二(6-溴己基)芴(M1): 在氮气保护下, 将甲醇(15 mL)和 20%的氢氧化钾水溶液(1 g KOH)滴入 2,7-二[(三甲硅基)炔基]-9,9-二(6-溴己基)芴(6.3 g, 9.2 mmol)的四氢呋喃溶液(20 mL)中. 滴完后, 反应液室温搅拌 1 h. 用注射器注入 $2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸溶液将体系中和至中性, 用乙酸乙酯萃取. 萃取液用水洗三次, 用食盐水洗涤一次, 用无水硫酸钠干燥. 减压脱溶剂后残余物用甲醇重结晶得到浅黄色晶体(4.35 g, 产率为 87%), 熔点为 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.64 (d, $J=8$ Hz, 2H), 7.49 (d, $J=8$ Hz, 2H), 7.45 (s, 2H), 3.28 (t, $J=6.8$ Hz, 4H), 3.16 (s, 2H), 1.92~1.96 (m, 4H), 1.62~1.69 (m, 4H), 1.02~1.21 (m, 8H), 0.52~0.60 (m, 4H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 150.89, 141.19, 131.64, 126.66, 121.18, 120.32, 84.62, 77.77, 55.31, 40.33, 34.15, 32.87, 29.24, 28.02, 23.70.

3-溴丙基-氨基甲酸叔丁酯(5): 将 3-溴丙胺氢溴酸盐(2.19 g, 10 mmol)溶于一定量的 1,4-二氧六环中, 将氢氧化钠水溶液(1.60 g NaOH, 50%)加入其中. 在冰浴的条件下, 将二碳酸二叔丁酯(3.28 g, 15 mmol)溶于 20 mL 1,4-二氧六环中, 后用恒压滴液漏斗缓缓滴入单口瓶中. 滴完后 $20\sim 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 反应约 4 h. 用水和乙酸乙酯共洗, 合并乙酸乙酯层, 用无水硫酸钠干燥, 抽滤, 减压脱溶剂, 得浅黄色粘稠液体(1.88 g, 产率 79%). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 4.89 (s, 1H), 3.37 (t, $J=10.2$ Hz, 2H), 3.19~3.23 (m, 2H), 1.97~2.02 (m, 2H), 1.43 (s, 9H).

1,4-二碘-2,5-二{(氮-叔丁氧羰基)-3'-氨基丙氧基}苯(M2): 在氮气气氛下, 在 250 mL 圆底烧瓶中加入碳酸钾(5.52 g, 67.4 mmol), 3-溴丙基-氨基甲酸叔丁酯(2.38 g, 10 mmol), 100 mL 丙酮, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 回流. 将 1,4-二碘-2,5-苯二酚(1.44 g, 4 mmol)溶于 50 mL 丙酮加入到烧瓶参与反应, 保持回流 72 h, 冷却至室温. 减压脱溶剂后, 用 100 mL 三氯甲烷溶解. 有机层用去离子水和食盐水洗涤, 用无水硫酸钠抽滤, 减压旋蒸脱溶剂, 层析柱提纯, 用石油醚/乙酸乙酯体积比为 8:1, 另加 1%三乙胺的溶液为洗脱液, 正己烷重结晶得白色晶体(1.35 g, 产率为 50%), 熔点为 $110\text{ }^{\circ}\text{C}$. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.18 (s, 2H), 5.05 (s, 2H), 4.00 (t, $J=5.7$ Hz, 4H), 3.39~3.42 (m, 4H), 2.02~2.06 (m, 4H), 1.44 (s, 18H); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 156.17, 152.79, 122.6, 86.17, 79.27, 68.69, 38.47, 29.38, 28.58.

4.2 聚合物的合成与表征

聚合物 PFP-Boc, PFP-NH₂ 和 PFPNBr-biotin 的合成路线如图 7 所示.

聚合物 PFP-Boc: 在避光且氮气保护下, 将鼓氮气除氧的二异丙胺/甲苯为 1:2 的 15 mL 混合溶剂加入 25

mL 二口烧瓶中, 瓶中预先装有 M1 (0.167 mg, 0.31 mmol)、M2 (202 mg, 0.3 mmol)、碘苯(13 mg, 0.064 mmol)、四(三苯基膦)钯(15 mg, 0.013 mmol)和碘化亚铜(3 mg, 0.016 mmol). 混合物在 $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 回流 24 h 后, 向其中注入碘苯(61 mg, 0.3 mmol)封端, 在氮气气氛下继续反应 2 h 后将反应液倾入大量去离子水中, 用二氯甲烷萃取三次, 合并有机相, 无水硫酸钠干燥, 抽滤后减压脱溶剂至粘稠状, 滴入甲醇/水体积比为 10:1 的 300 mL 混合溶剂中, 沉降, 抽滤. 溶解后再倒入 300 mL 甲醇溶液中沉降两次, 抽滤后真空干燥, 得到黄色纤维状固体(0.23 g, 产率为 70%). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.64~7.72 (m, 2H), 7.40~7.58 (m, 2H), 7.30~7.38 (m, 2H), 7.11 (s, 2H), 4.96 (s, 2H), 4.10~4.22 (m, 4H), 3.38~3.48 (m, 4H), 3.24~3.34 (m, 4H), 3.01~3.09 (m, 4H), 1.94~2.17 (m, 8H), 1.53~1.72 (m, 4H), 1.39 (s, 18H), 1.04~1.26 (m, 4H), 0.53~0.70 (m, 4H). $M_n=13600$, $M_w=20000$, 分子量分布指数=1.47.

聚合物 PFP-NH₂: 将 PFP-Boc (200 mg, 0.2 mmol (按聚合物重复单元计算))溶解在 60 mL 氯仿中, 常温下, 将 2 mL 三氟乙酸注入上述溶液中, 室温反应过夜. 减压脱去大部分溶剂, 加入 $2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液至 pH 为 12, 加入乙酸乙酯萃取, 减压脱溶剂至粘稠状, 于石油醚中沉降, 得黄色纤维状固体(79 mg, 产率 66%).

聚合物 PFPNBr-biotin: 在氮气气氛下, 将 PFP-NH₂ (68 mg, 约 0.11 mmol)、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(60 mg, 0.31 mmol)、生物素(60 mg, 0.25 mmol)、吡啶 50 mL 加入 250 mL 二口烧瓶中, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 反应过夜. 减压蒸馏除去吡啶, 向其中加入 30 mL 四氢呋喃, 于 $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下, 将 10 mL 三甲胺滴入其中, 溶液中有白色沉淀产生, 继续滴加四氢呋喃将其溶解, 滴完后 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 反应 24 h. 减压脱溶剂后溶于甲醇透析 5 d, 冷冻干燥得黄色蓬松颗粒状固体(54 mg, 产率 46%).

4.3 蛋白质的检测

将 1 mg 聚合物 PFPNBr-biotin(重复单元的相对分子量约为 1000)溶解到 1 mL 甲醇/水混合溶剂(甲醇/水体积比为 8:2)得到浓度为 $100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 PFPNBr-biotin 母液. 分别将一定量的链霉亲和素(SA)、溶菌酶(Lys)、免疫球蛋白(IgG)、血红蛋白(Hb)、牛血清蛋白(BSA)加入到 $100\text{ }\mu\text{L}$ 母液中, 然后加入一定量不同 pH 的缓冲液, 使终体积为 1 mL(该体系中 PFPNBr-biotin 浓度为 $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 蛋白浓度为 $50\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$). $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min, 使 PFPNBr-biotin 与蛋白充分结合. 最后, 在室温下测定荧光发射光谱, 激发波长 413 nm. 空白对照为未加任何蛋白的 PFPNBr-biotin 母液在不同 pH 缓冲液中的样品.

References

- [1] Beaujuge, P. M.; Reynolds, J. R. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 268.
- [2] Facchetti, A. *Chem. Mater.* **2011**, *23*, 733.
- [3] Duarte, A.; Pu, K. Y.; Liu, B.; Bazan, G. C. *Chem. Mater.* **2011**, *23*,

- 501.
- [4] Xie, L. H.; Yin, C. R.; Lai, W. Y.; Fan, Q. L.; Huang, W. *Prog. Polym. Sci.* **2012**, *37*, 1192.
- [5] Cheng, Y. J.; Yang, S. H.; Hsu, C. S. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 5868.
- [6] Ye, H. Y.; Li, W.; Li, W. S. *Chin. J. Org. Chem.* **2012**, *32*, 266. (叶怀英, 李文, 李维实, 有机化学, **2012**, *32*, 266.)
- [7] Liu, X. F.; Fan, Q. L.; Huang, W. *Biosens. Bioelectron.* **2011**, *26*, 2154.
- [8] Liu, B.; Bazan, G. C. *Chem. Mater.* **2004**, *16*, 4467.
- [9] Thomas, S. W.; Joly, G. D.; Swagger, T. M. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 1339.
- [10] Zhu, C. L.; Liu, L. B.; Yang, Q.; Lv, F. T.; Wang, S. *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 4687.
- [11] Zeng, W. N.; Qi, J. P.; Wang, L. Y.; Cao, D. R. *Chin. J. Org. Chem.* **2009**, *29*, 1858. (曾文南, 仝金萍, 汪凌云, 曹德榕, 有机化学, **2009**, *29*, 1858.)
- [12] Bao, B. Q.; Ma, M. F.; Fan, Q. L.; Wang, L. H.; Huang, W. *Acta Chim. Sinica* **2013**, *71*, 1379. (鲍碧清, 马明风, 范曲立, 汪联辉, 黄维, 化学学报, **2013**, *71*, 1379.)
- [13] Zhang, S.; Qiu, T.; Guan, H. L.; He, Z. K. *Acta Chim. Sinica* **2009**, *67*, 2827. (张书, 邱婷, 关洪亮, 何治柯, 化学学报, **2009**, *67*, 2827.)
- [14] Xiao, Y.; Hu, Y. Q.; Huang, H. M.; Yin, D. L.; Xiao, X. M. *Acta Chim. Sinica* **2011**, *69*, 838. (肖毅, 胡玉琴, 黄红梅, 尹笃林, 肖小明, 化学学报, **2011**, *69*, 838.)
- [15] Kim, I. B.; Erdogan, B.; Wilson, J. N.; Bunz, U. H. F. *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 6247.
- [16] Kim, I. B.; Dunkhorst, A.; James, G.; Bunz, U. H. F. *Macromolecules* **2005**, *38*, 4560.
- [17] Kim, I. B.; Dunkhorst, A.; Bunz, U. H. F. *Langmuir* **2005**, *21*, 7985.
- [18] Yu, M. H.; Tang, Y. L.; He, F.; Wang, S.; Zheng, D. G.; Li, Y. L.; Zhu, D. B. *Macromol. Rapid Commun.* **2006**, *27*, 1739.
- [19] Yu, M. H.; Liu, L. B.; Wang, S. *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.-UK* **2008**, *46*, 7462.
- [20] VanVeller, B.; Swagger, T. M. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 5761.
- [21] An, L. L.; Liu, L. B.; Wang, S. *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 454.
- [22] Wosnick, J. H.; Mello, C. M.; Swagger, T. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 3400.
- [23] Tang, Y. L.; He, F.; Yu, M. H.; Feng, F. D.; An, L. L.; Sun, H.; Wang, S.; Li, Y. L.; Zhu, D. B. *Macromol. Rapid Commun.* **2006**, *27*, 389.
- [24] Lee, K.; Lee, J.; Eun, J. J.; Kronk, A.; Elenitoba-Johnson, K.; Lim, M. S.; Kim, J. S. *Adv. Mater.* **2012**, *24*, 2479.
- [25] Cai, X. H.; Shi, L.; Liu, X. F.; Huang, Y. Q.; Fan, Q. L.; Huang, W. *Prog. Chem.* **2013**, *25*, 975. (蔡小慧, 石琳, 刘兴奋, 黄艳琴, 范曲立, 黄维, 化学进展, **2013**, *25*, 975.)
- [26] Huang, Y. Q. *Ph.D. Dissertation*, Fudan University, Shanghai, **2006**. (黄艳琴, 博士论文, 复旦大学, 上海, **2006**.)

(Zhao, C.)