寡聚(4-乙烯基苯基磷酸)/金纳米粒子的磷酸酶可视化检测研究

范艳斌^{a,b} 陈道勇^{*,a,b}

(^a 复旦大学高分子科学系 上海 200433)

(^b 聚合物分子工程国家重点实验室 上海 200433)

摘要 基于金属纳米粒子的磷酸酶可视化检测技术具有重要的生物医用前景。然而,文献中报道的方法大多采用多肽或核酸等生物分子作为磷酸酶感应基团。由于这些生物分子在水溶液中不稳定,且可被磷酸酶以外的生物酶类降解,导致这些方法在实际应用中存在局限性。首次合成了一种化学结构稳定的水溶性寡聚(4-乙烯基苯基磷酸)[oligo(4-vinyl-phenyl phosphate), OVPP],并制备得到由OVPP稳定的磷酸酶响应型金纳米粒子 Au@OVPP,最后以酸性磷酸酶为例,考察了 Au@OVPP 在磷酸酶可视化检测方面的应用。由于 OVPP 的亲水性, Au@OVPP 可在水溶液中稳定分散;当体系中存在磷酸酶时,由于 OVPP 中的亲水基团(磷酸根)被磷酸酶水解释放,使得 Au@OVPP 的稳定分子 OVPP 由亲水变为疏水,进而导致金纳米粒子的聚集及溶液宏观颜色的改变。通过(肉眼)观察 Au@OVPP 溶液的变色及程度,建立了一种灵敏、专一和低成本的磷酸酶检测方法。该方法对于酸性磷酸酶的(肉眼)检测下限约为 10 U/mL,且对多种生物分子具有较好的抗干扰能力。

关键词 金纳米粒子; 磷酸衍生物; 磷酸酶; 可视化; 检测

Oligo(4-Vinyl-Phenyl Phosphate)/Gold Nanoconjugate for Visual Detection of Phosphatases

Fan, Yanbin^{a,b} Chen, Daoyong^{*,a,b}

(^a Department of Macromolecular Science, Fudan University, Shanghai 200433)

(^b State Key Laboratory of Molecular Engineering of Polymer, Shanghai 200433)

Abstract Colorimetric assay taking advantage of the unique surface plasmon resonance properties of metallic nanoparticles has attracted significant attention in bioassays due to its simplicity, low cost, high sensitivity and compatibility. However, most reported colorimetric methods used adenosine triphosphate (ATP), peptides or nucleotides (DNA and RNA) as the phosphatase-sensing species, which are quite unstable or hydrolysable by other enzymes in normal conditions. In this paper, a chemically stable and hydrophilic oligo(4-vinyl-phenyl phosphate) (OVPP) was synthesized. Specifically, the oligomer precursor oligo(dibenzyl-4-vinylphenyl phosphate) was synthesized via RAFT polymerization of a synthetic monomer dibenzyl-4-vinylphenyl phosphate in dioxane, using *S*-ethyl-*S'*-(α,α' -dimethyl- α)-acetic acid) trithiocarbonate as the chain transfer agent. Deprotection by trimethylsilyl bromide in deuterochloroform containing 2,4,6-collidine at 0 °C and then hydrolysis in water at pH 9.0 gives the desired OVPP. Then, an OVPP-stabilized and phosphatase-responsive gold nanoparticle was prepared via simple ligand exchange in water and finally tested for visual detection of a model phosphatase acid phosphatase (ACP). Due to the hydrophilicity of OVPP, Au@OVPP is soluble and stable in water. In the presence of ACP, however, the hydrophilic phosphate groups in OVPP were hydrolyzed and released, transforming the hydrophilic OVPP of Au@OVPP into hydrophobic type. This change from hydrophilicity to hydrophobicity triggered the aggregation and color changes of the gold nanoparticles and their sols, respectively. Via this method, a sensitive visual detection of ACP was achieved, with a detection limit of *ca.* 10 U/mL after 24 h incubation at pH 5.0 and 37 °C. Besides, a high selectivity for the phosphatase detection was confirmed as controlled with other bio-species including esterase, proteinase, serum proteins, DNA and so on. By using pyrene as a polarity probe, a significant decrease of the ratio I_{373}/I_{384} was found in Au@OVPP sols after incubation with ACP, indicating the hydrolysis of OVPP and formation of hydrophobic domains in the ACP activated solutions. Collectively, Au@OVPP represents a chemically stable, low cost, highly sensitive and specific phosphatase-visualization agent for phosphatase detection.

Keywords gold nanoparticle; phosphate derivate; phosphatase; visualization; detection

* E-mail: chendy@fudan.edu.cn; Tel.: 0086-021-65643989

Received May 4, 2014; published July 8, 2014.

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

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 21334001 and 91127030) and the Ministry of Science and Technology of China (No. 2011CB932503).

项目受国家自然科学基金(Nos. 21334001, 91127030)及科技部 973 项目基金(No. 2011CB932503)资助。

1 引言

生物学上,磷酸酶通过特异性地水解释放底物上的磷酸根来改变底物的亲疏水性,进而实现对底物分子的构象及功能的调控^[1].由于磷酸酶广泛参与细胞内的信号转导过程,其含量或活性的异常与多种疾病密切相关^[2-4].例如,磷酸酶参与胰岛素受体的信号传导途径,其调控下的底物去磷酸化水平直接影响着上游胰岛素的刺激响应过程^[3].因此,对于磷酸酶含量及其活性的检测具有重要的临床应用前景^[5-15].

目前常用的磷酸酶检测技术主要包括抗体法(如免疫印迹和酶联反应等)^[8]和底物法(水解后的底物带有荧光或紫外吸收)^[9].例如,在磷酸酶作用下,底物硝基苯酚磷酸酯可被转化成硝基苯酚,后者在 405 nm 处有着强烈的紫外吸收;通过检测该处的紫外吸收值,可实现对磷酸酶的定量检测^[9].然而,这些传统方法存在如下不足:一、成本高,抗体等蛋白试剂通常较为昂贵且容易失活;二、无法即时、快速检测,传统检测方法通常需要如紫外-可见和荧光光谱仪等大型仪器设备来协助分析,且需要专业人员进行操作.最近,一种基于金属(如金和银等)纳米粒子的“肉眼”检测技术引起了广泛的关注^[10-15],并有望为上述不足提供解决方案.该技术的设计思想为,利用金属纳米粒子特有的表面等离子共振性质,将金属纳米粒子设计成稳定性受磷酸酶调控的体系,如磷酸酶能够破坏或重建纳米粒子在溶液中的稳定性,进而引起金属纳米粒子的聚集或重新分散,同时伴随着溶液宏观颜色的变化.通过“肉眼”观察这种溶液的颜色变化,可方便地对样品中磷酸酶的含量及活性进行评估.Choi 等^[10]设计了一种磷酸酶响应的“电荷反转型”金纳米粒子,即在磷酸酶作用下,部分金纳米粒子的表面电荷发生反转(负电荷变为正电荷),导致该部分金纳米粒子与溶液中带相反电荷的粒子发生聚集,同时伴随着溶液颜色的变化.类似地,Li 等^[11-13]构建了以三磷酸腺苷(ATP)为基础的磷酸酶检测手段,即在磷酸酶作用下,银纳米粒子的稳定基团 ATP 被转化为二磷酸腺苷(ADP);由于 ADP 不足以稳定银纳米粒子,从而导致银纳米粒子聚集以及溶液颜色的变化.需要指出的是,文献中报道的方法大多采用多肽、核酸^[12]、ATP 或抗坏血酸^[13]等生物分子构建磷酸酶检测体系,由于这些生物分子的化学结构不稳定(如 ATP 易分解为 ADP^[16],而抗坏血酸易被氧化为脱氢抗坏血酸)^[17],且多肽和核酸等分子可被其他生物酶类如蛋白酶或核酸酶等降解,导致这些方法在实际生物样品的测试中存在局限性.

本文首次合成了一种主链由 C—C 键构成的化学结构稳定的水溶性寡聚(4-乙烯基苯基磷酸) [oligo(4-vinyl-phenyl phosphate), OVPP],并将其修饰到 10 nm 金粒子表面,制备得到一种由 OVPP 稳定的磷酸酶可视化检测试剂 Au@OVPP.由于 OVPP 的亲水性,Au@OVPP

能够稳定分布在水溶液中;当溶液中存在磷酸酶时,由于 OVPP 中的亲水基团(磷酸根)被磷酸酶水解释放,使得 Au@OVPP 的稳定分子 OVPP 由亲水变为疏水,进而导致金纳米粒子的聚集及溶液宏观颜色的改变.通过肉眼观察 Au@OVPP 溶液的颜色及程度,建立了一种灵敏、专一、便捷和低成本的磷酸酶检测方法(图式 1).

图式 1 基于 Au@OVPP 的磷酸酶可视化检测技术的原理示意图
Scheme 1 Schematic illustration of Au@OVPP-based visual detection strategy for phosphatases

2 结果与讨论

2.1 OVPP 的合成策略与结构分析

OVPP 的合成步骤如实验部分 4.1 节中所述.为了向 OVPP 中引入与金相互作用的端基(如巯基、二硫键和三硫酯等),采用 RAFT 聚合的方法制备端基含有三硫酯的 OVPP 的前驱体,即寡聚(4-乙烯基苯基磷酸二苄酯)^[18,19].将该寡聚物进一步硅烷化、水解^[20,21],即得端基含有三硫酯的水溶性 OVPP. OVPP 的分子式如图 1A 中所示.运用核磁(¹H, ³¹P NMR)对 OVPP 的结构进行表征.在 OVPP 的 ¹H NMR 谱中(图 1A),位于 δ 2.5~0.6 之间的宽峰对应于 RAFT 链转移剂上的氢原子的化学位移;通过比较该处与位于 δ 6.8~6.0 之间峰的积分面积,得到 OVPP 的聚合度约为 8.在 OVPP 的 ³¹P NMR 谱中(图 1B),只观察到一个位于 δ 1.03 处的单峰,根据文献^[20, 21],该单峰对应于 OVPP 中的磷酸基团的化学位移.据此,成功合成出端基含有三硫酯、侧链含有磷酸单酯的亲水型 OVPP.

2.2 Au@OVPP 的表征

在 pH 9.0 下,借助 OVPP 端基上的三硫酯与金粒子之间的相互作用,通过配体交换和离心分离的方法制备 OVPP 修饰的金纳米粒子^[22],即 Au@OVPP (实验部分 4.1 节).运用透射电镜(TEM)、动态光散射(dynamic light scattering, DLS)和紫外-可见吸收(UV-Vis)表征 Au@OVPP.如图 2A 中所示,Au@OVPP 中的金纳米粒子为直径在 10 ± 0.3 nm 的球形粒子.DLS 结果显示,Au@OVPP 的流体动力学直径约为 22 nm,大于相应的柠檬酸稳定的金纳米粒子(Au@Citrate)的流体动力学直径(约 16 nm),表明 OVPP 被成功地修饰到金纳米粒子表面(图 2B).UV-Vis 结果显示,Au@OVPP 的最大吸收峰位于 524 nm,而相应的 Au@Citrate 的最大吸收峰位于

图1 室温下, OVPP 在氘代水中的 500 MHz ^1H (A) 和 ^{31}P (B) NMR 谱图

Figure 1 500 MHz ^1H (A) and ^{31}P (B) NMR spectra of OVPP in D_2O at room temperature

520 nm (图 S1, supporting information).

2.3 磷酸酶的可视化检测

Hawker 等^[20]通过 ATRP 方法合成了具有磷酸酶响应性的两嵌段共聚物 PEG-block-OVPP, 发现酸性磷酸酶(acid phosphatase, ACP)能够有效作用于嵌段共聚物中的 OVPP 嵌段, 水解并释放其中的磷酸根基团, 导致 OVPP 嵌段从亲水变为疏水, 进而诱导嵌段共聚物在水中自组装形成纳米组装体. 本工作中, 我们制备了由 OVPP 稳定的金纳米粒子 (Au@OVPP), 并考察 Au@OVPP 在磷酸酶可视化检测方面的应用. 以 ACP 作为模型磷酸酶, 首先考察含有 ACP 的 Au@OVPP 溶液的变色行为. 如图 3A 中所示, 将不同浓度的 ACP 与 5.0 nmol/L 的 Au@OVPP 在 37 $^\circ\text{C}$ 下培养 24 h 后, Au@OVPP 溶液出现了不同程度的变色现象, 且随着 ACP 含量的增加, 变色现象更加明显. 作为对照, 将与变色样品中同等量的经过变性处理(60 $^\circ\text{C}$, 1.0 h)的 ACP 加入 5.0 nmol/L Au@OVPP 溶液中, 并在与上述实验相同条件下培养 24 h 后, 未观察到明显的变色现象, 表明上述 Au@OVPP 溶液的变色由 ACP 的酶解作用导致. 值得注意的是, 当溶液中 ACP 的含量大于或等于 10 U/mL 时, 肉眼能够有效观察到溶液的变色现象(图 3A). 因此, 该方法对于 ACP 的(肉眼)检测下限约为 10 U/mL(约 0.02 mg/mL).

图2 室温下, 1.0 nmol/L 的 Au@OVPP 在水中的 TEM 照片(A), 以及 1.0 nmol/L Au@OVPP 或 1.0 nmol/L Au@Citrate 在水中的流体力学直径分布曲线(B, DLS 测定)

Figure 2 A typical TEM image of Au@OVPP (1.0 nmol/L) in water (A) and the hydrodynamic diameter distribution profiles of Au@OVPP (1.0 nmol/L) or Au@Citrate (1.0 nmol/L) in water as revealed by DLS (B) at room temperature

图3 37 $^\circ\text{C}$ 下, 将 0.7 mL 含有 5.0 nmol/L Au@OVPP 的柠檬酸钠缓冲溶液(5.0 mmol/L, pH 5.0)与不同量的 ACP 共培养 24 h 后的照片(A), 以及相应样品的紫外-可见吸收光谱(B)

Figure 3 A photograph of vials containing 0.7 mL citrate buffer (5.0 mmol/L, pH 5.0) suspended with 5.0 nmol/L Au@OVPP in each vial after incubation with different contents of ACP for 24 h at 37 $^\circ\text{C}$ (A), and the corresponding UV-Vis spectra at room temperature (B)

测定上述样品的紫外-可见吸收光谱(UV-Vis, 图 3B). 结果显示, ACP 的加入使得 Au@OVPP 的最大吸收波段发生显著的红移, 且波谱呈现增宽现象, 表明溶液中出现了较大尺寸的金纳米粒子的聚集体^[23]. 运用 DLS 和 TEM 研究磷酸酶作用后溶液中金纳米粒子的流体力学直径和形貌(图 S2, supporting information). 结果表明, 磷酸酶作用后, 溶液中金纳米粒子的流体力学直径显著增加, 且通过 TEM 观测到了较大尺寸的金纳米粒子的聚集体, 证明了溶液中金纳米粒子的聚集现象. 如前所述, ACP 能够有效作用于 Au@OVPP 中的 OVPP 部分, 水解并释放其中的亲水基团磷酸根, 使得 Au@OVPP 的稳定基团由亲水变为疏水, 进而导致 Au@OVPP 的聚集和溶液颜色的改变. 进一步地, 选用苾探针表征 ACP 作用前后的 Au@OVPP 溶液中亲疏水环境的变化(图 S3, supporting information). 结果显示, ACP 作用后, Au@OVPP 溶液中的 I_{373}/I_{384} 比值显著降低, 表明溶液中的疏水区域增多, 进一步证实上述金纳米粒子的聚集由 ACP 的酶解作用导致.

由上可知, 随着 Au@OVPP 溶液变色(聚集)程度的增加, 其最大吸收波段由原来的 524 nm 红移至约 600 nm 左右, 因此, 524 和 600 nm 处吸光度的比值(A_{524}/A_{600})可用于表征溶液中金纳米粒子的变色(聚集)程度^[10-15]. 相应地, 本文计算了上述样品的 UV-Vis 吸收光谱中 524 和 600 nm 处吸光度的比值(A_{524}/A_{600}), 并将该比值与 ACP 的浓度进行作图, 得到图 4 中所示曲线. 可见, A_{524}/A_{600} 的值与 ACP 的浓度成负相关, 即随着 ACP 浓度的增加, A_{524}/A_{600} 的数值逐渐减小, 对应于溶液的变色程度增加. 由此, 得到了 Au@OVPP 溶液的变色程度与溶液中磷酸酶含量之间的半定量关系, 即变色程度越大 (A_{524}/A_{600} 值越小), 磷酸酶的含量(活性)越高.

图 4 37 °C 下, 不同浓度的 ACP 与 5.0 nmol/L Au@OVPP 共培养 24 h 后的 A_{524}/A_{600} 值与 ACP 浓度的依赖性作图

Figure 4 A_{524}/A_{600} value versus ACP concentration plotting after the incubation of 5.0 nmol/L Au@OVPP with various concentrations of ACP for 24 h at 37 °C

2.4 专一性

为了检验 Au@OVPP 的磷酸酶可视化检测的专一性, 在与上述实验相同的条件下, 将不同的生物分子与

Au@OVPP 共培养 24 h. 如图 5 中所示, 将 Au@OVPP 与 ACP 共培养时, 溶液发生显著变色(图 5A), 且溶液中 A_{524}/A_{600} 值显著降低(图 5B); 而当 Au@OVPP 与相同质量分数的 ATP、牛血清白蛋白(BSA)、胰蛋白酶(Trypsin, Trp)、麦芽脂酶(wheat germ lipase, WGL)或 DNA 共培养时, 溶液无明显的变色现象发生(A_{524}/A_{600} 值无明显下降), 表明 Au@OVPP 的磷酸酶可视化检测具有显著的专一性.

图 5 37 °C 下, 将 0.7 mL 含有 5.0 nmol/L Au@OVPP 的柠檬酸钠缓冲溶液(5.0 mmol/L, pH 5.0)与不同生物分子(0.02 mg/mL)共培养 24 h 后的照片(A), 以及相应样品的 A_{524}/A_{600} 数值(B)

Figure 5 A photograph of vials containing 0.7 mL citrate buffer (5.0 mmol/L, pH 5.0) suspended with 5.0 nmol/L Au@OVPP in each vial after incubation with different bio-species (0.02 mg/mL) for 24 h at 37 °C (A), and the corresponding A_{524}/A_{600} values (B)

3 结论

合成了一种化学结构稳定的水溶性寡聚(4-乙烯基苯基磷酸)(OVPP), 将 OVPP 与金纳米粒子复合制备得到一种由 OVPP 稳定的磷酸酶可视化检测试剂 Au@OVPP. 在磷酸酶作用下, Au@OVPP 的水溶液颜色发生改变, 且磷酸酶含量(活性)越高, 溶液的变色程度越大. 借助于这种溶液的变色程度与磷酸酶含量之间的半定量关系, 建立了一种灵敏、专一、便捷和低成本的磷酸酶可视化检测方法. 相比于同类试剂而言, Au@OVPP 具有化学结构稳定和抗生物分子干扰能力强等特点.

4 实验部分

4.1 Au@OVPP 的制备

参考文献分别合成单体 4-乙烯基苯基磷酸二苄酯^[18]和 RAFT 聚合反应链转移剂 *S*-ethyl-*S'*-(α, α' -di-

methyl- α -acetic acid)trithiocarbonate (RAFT CTA)^[19]. 准确称取 6.6 mg RAFT CTA (29.25 μ mol), 1.0 mg 偶氮二异丁腈(AIBN, 重结晶, 6 μ mol)和 1.1119 g 单体(2.925 mmol)并溶于 2.0 mL 二氧六环中, 小心转移溶液至配有磁子的 20 mL 安培管中, 冻融脱气五次除氧. 火焰灯下封管后, 将溶液温度升至 70 $^{\circ}$ C, 并于氩气氛下反应 8 h. 反应结束后, 加入 2 mL 氯仿稀释反应液, 并于 20 mL 冰的无水乙醚中沉淀. 过滤沉淀后, 用约 2 mL 氯仿重新溶解产物, 再于 20 mL 冰的无水乙醚中沉淀, 重复此操作三次. 将所得产物于室温下真空干燥 48 h, 即得寡聚(4-乙烯基苯基磷酸二苄酯). 参照文献报道方法^[20,21], 将该寡聚物在 2,4,6-可力丁和三甲基溴硅烷作用下转化为易水解的硅烷酯, 最后于 pH 9.0 中水解该硅烷酯, 得终产物 OVPP.

参照文献制备直径在 10~12 nm 的金纳米粒子^[22]. 取约 20 mL 制备得到的柠檬酸稳定的金纳米粒子溶液, 离心浓缩至 4 mL (13500 r/min, 20 min, 15 $^{\circ}$ C; 约 100 nmol/L), 再用 0.5 mol/L Na_2CO_3 的水溶液调节溶液 pH 至 9.0. 剧烈搅拌下, 逐渐加入 2 mL 含有 12.6 mg OVPP 的去离子水, 室温下搅拌过夜. 离心分离金纳米粒子后, 加入 4 mL 去离子水洗涤并再次离心. 重复此操作三次, 并将最后得到的金纳米粒子重悬于 4 mL 去离子水中, 即得 100 nmol/L Au@OVPP 的贮存液.

4.2 Au@OVPP 与生物分子的相互作用

用去离子水将 100 nmol/L Au@OVPP 的贮存液稀释至 10 nmol/L, 再与等体积的柠檬酸钠缓冲液(10 mmol/L, pH 5.0)混合, 得 5.0 nmol/L Au@OVPP 的柠檬酸钠缓冲溶液(5.0 mmol/L, pH 5.0). 分别移取 0.7 mL 上述溶液至 7 个容积为 2.0 mL 小瓶中, 并依次加入 0.5, 1.2, 2.5, 5.0, 10, 30 及 60 U/mL 的 ACP 至上述小瓶中, 最后将样品于 37 $^{\circ}$ C 下振荡培养(120 r/min) 24 h. Au@OVPP 与其他生物分子(0.02 mg/mL)共培养的操作步骤同上.

向上述培养液中加入等体积的柠檬酸钠缓冲溶液

(5.0 mmol/L, pH 5.0), 并于常温下测定其 400~900 nm 处的 UV-Vis 吸收曲线(型号 UV2500).

References

- [1] Cohen, P. *Nat. Cell Biol.* **2002**, *4*, E127.
- [2] Mijakovic, I.; Poncet, S.; Galinier, A.; Monedero, V.; Fieulaine, S.; Janin, J.; Nessler, S.; Marquez, J. A.; Scheffzek, K.; Hasenbein, S.; Hengstenberg, W.; Deutscher, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 13442.
- [3] Goldstein, B. J.; Bittner-Kowalczyk, A.; White, M. F.; Harbeck, M. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 4283.
- [4] Husberg, C.; Agnetti, G.; Holewinski, R. J.; Christensen, G.; Van Eyk, J. E. *Proteomics* **2012**, *12*, 973.
- [5] Li, P.; Lu, L. *Chin. J. Inorg. Chem.* **2013**, *29*, 1830. (李鹏宇, 卢丽萍, 无机化学学报, **2013**, *29*, 1830.)
- [6] Zhang, X.; Huang, Y.; Fan, C.; Huang, W. *Chem. J. Chin. Univ.* **2011**, *32*, 2548. (张小平, 黄艳琴, 樊春海, 黄维, 高等学校化学学报, **2011**, *32*, 2548.)
- [7] Gao, X.; Lu, L.; Zhu, M.; Yuan, C.; Ma, J.; Fu, X. *Acta Chim. Sinica* **2009**, *67*, 929. (高晓丽, 卢丽萍, 朱苗力, 袁彩霞, 马俊峰, 付学奇, 化学学报, **2009**, *67*, 929.)
- [8] Bross, P.; Naundrup, S.; Hansen, J.; Nielsen, M. N.; Christensen, J. H.; Kruhoff, M.; Palmfeldt, J.; Corydon, T. J.; Gregersen, N.; Ang, D.; Georgopoulos, C.; Nielsen, K. L. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 15694.
- [9] Iqbal, J. *Anal. Biochem.* **2011**, *414*, 226.
- [10] Choi, Y.; Ho, N. H.; Tung, C. H. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, *46*, 707.
- [11] Wei, H.; Chen, C.; Han, B.; Wang, E. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 7051.
- [12] Zhao, W.; Chiuman, W.; Lam, J. C.; Brook, M. A.; Li, Y. *Chem. Commun.* **2007**, *36*, 3729.
- [13] Li, C. M.; Zhen, S. J.; Wang, J.; Li, Y. F.; Huang, C. Z. *Biosens. Bioelectron.* **2013**, *43*, 366.
- [14] Jiao, H.; Chen, J.; Li, W.; Wang, F.; Zhou, H.; Li, Y.; Yu, C. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, *6*, 1979.
- [15] Hayat, A.; Gonca, B.; Andreescu, S. *Biosens. Bioelectron.* **2014**, *56*, 334.
- [16] Chance, B.; Lees, H.; Postgate, J. G. *Nature* **1972**, *238*, 330.
- [17] Widengren, J.; Chmyrov, A.; Eggeling, C.; Löfdahl, P.-Å.; Seidel, C. A. J. *J. Phys. Chem. A* **2007**, *111*, 429.
- [18] Andrus, M. B.; Liu, J. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 5811.
- [19] Convertine, A. J.; Lokitz, B. S.; Vasileva, Y.; Myrick, L. J.; Scales, C. W.; Lowe, A. B.; McCormick, C. L. *Macromolecules* **2006**, *39*, 1724.
- [20] Amir, R. J.; Zhong, S.; Pochan, D. J.; Hawker, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 13949.
- [21] Fan, Y.; Li, F.; Chen, D. *Biomaterials* **2014**, *35*, 7870.
- [22] Jana, N. R.; Gearheart, L.; Murphy, C. J. *Langmuir* **2001**, *17*, 6782.
- [23] Nam, J.; Won, N.; Jin, H.; Chung, H.; Kim, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 13639.

(Zhao, X.)