基于水溶性共轭聚合物分子刷的高灵敏凝血酶生物传感器

刘兴奋^{*a} 王亚腾^a 黄艳琴^a 冯晓苗^a 范曲立^a 黄维^{a,b}

(^a 南京邮电大学信息材料与纳米技术研究院 有机电子与信息显示国家重点实验室培育基地 江苏省有机电子和信息显示协同创新中心 南京 210023)

(^b 南京工业大学先进材料研究院 江苏省柔性电子重点实验室 先进生物与化学制造协同创新中心 南京 211816)

摘要 以刷子状水溶性共轭聚芴(PFNI)为传感材料,以荧光素标记的核酸适体(FAM-apt15)为探针,设计了一种检测凝血酶的高灵敏度蛋白质传感器。PFNI的刷状结构带有大量正电荷,与负电荷的柔性单链核酸探针形成静电复合物,使能量供体(PFNI)与受体(FAM)之间的距离较近,发生高效荧光共振能量转移(Föster resonance energy transfer, FRET)。当探针与靶凝血酶结合时,形成刚性且体积较大的G-四链体/凝血酶复合物,由于体积位阻和密集的刷子的阻碍作用,PFNI与FAM之间的距离被拉大,FRET效率显著降低。对缓冲溶液中凝血酶检测的最低检测限可达0.05 nmol/L。与基于线型共轭聚合物的蛋白质检测方法相比,灵敏度提高了至少一个数量级。

关键词 共轭聚合物; 核酸适体; 荧光共振能量转移; 凝血酶; 生物传感器

Highly Sensitive Protein Biosensor based on a Conjugated Polymer Brush

Liu, Xingfen^{*a} Wang, Yateng^a Huang, Yanqin^a Feng, Xiaomiao^a
Fan, Quli^a Huang, Wei^{a,b}

(^a Key Laboratory for Organic Electronics & Information Displays and Institute of Advanced Materials, Jiangsu National Synergetic Innovation Center for Advanced Materials, Nanjing University of Posts and Telecommunications, Nanjing 210023, China)

(^b Key Laboratory of Flexible Electronics & Institute of Advanced Materials, Jiangsu National Synergetic Innovation Center for Advanced Materials, Nanjing Tech University (Nanjing Tech), Nanjing 211816, China)

Abstract Simple and sensitive detection of proteins is crucial in biological analysis and medical diagnosis. Conjugated polymers (CPs) with π -conjugated backbones were recognized as having excellent light-harvesting capability and high fluorescent quantum yield. They have been widely used as an energy donor to amplify fluorescence signal via high efficient Föster resonance energy transfer (FRET). In particular, conjugated polymer brush with high charge density provides more possibilities due to stronger electrostatic interactions with negatively charged biomolecules. Here, we developed a highly sensitive protein biosensor for thrombin detection based on a conjugated polymer brush (PFNI) and a fluorescein-labeled aptamer (FAM-apt15). PFNI is a water-soluble cationic polyfluorene derivate with extremely high charge density (78 positive charges per repeat unit). PFNI can attract negatively charged aptamer through strong electrostatic interactions. In this case, the energy donor (PFNI) and acceptor (FAM) are in a close proximity, which results in an efficient FRET process and a high FRET signal. However, when the FAM-apt15 combines with the target protein, a rigid and big-sized G-quadruplex/thrombin complex formed. Due to the steric hindrance from the densely brush of PFNI, the distance between the two fluorophores increased significantly, leading to an inefficient FRET process and a low FRET signal. The strategy exhibits excellent specificity and the limit of detection (LOD) for thrombin in buffer was estimated to be 0.05 nmol/L. It also works well in diluted serum and a LOD of 0.2 nmol/L can be obtained. Compared to the biosensors based on traditional linear conjugated polymers, the sensitivity was improved by one order of magnitude. In addition, our strategy also shows the merits of simple, label-free, and low-cost because labeled DNA is much more expensive than unlabeled one. Based on the specific binding of aptamer and protein, this novel method can be extended to a highly sensitive detection of more proteins.

Keywords conjugated polymer; aptamer; Föster resonance energy transfer; thrombin; biosensor

* E-mail: iamxfliu@njupt.edu.cn

Received April 25, 2016; published July 11, 2016.

Project supported by the National Basic Research Program of China (Nos. 2012CB933301, 2012CB723402), the National Natural Science Foundation of China (Nos. 21005040, 51173080), the Ministry of Education of China (No. IRT1148), the Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions (PAPD), the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK20141424), Program of Scientific Innovation Research of College Graduate in Jiangsu Province (CXLX12_0792) and Research Program of Nanjing University of Posts and Telecommunications (NY215171).

项目受国家重点基础研究发展计划项目(Nos. 2012CB933301, 2012CB723402)、国家自然科学基金(Nos. 21005040, 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资助项目、江苏省自然科学基金(BK20141424)、江苏省普通高校研究生科研创新计划项目(CXLX12_0792)及南京邮电大学科研项目(NY215171)资助。

1 引言

凝血酶(thrombin)是一种可使纤维蛋白原转化成纤维蛋白,诱发血小板聚集,从而促进血液凝固的蛋白质.在炎症、贫血、创伤愈合等过程中发挥着重要作用,同时也参与血栓形成、血管生成、肿瘤生长和转移等一系列重要的生理和病理过程^[1,2].因此,凝血酶的高灵敏度检测在临床诊断中具有重要的意义.核酸适配体是一类DNA或RNA寡聚核苷酸,能特异性识别金属离子^[3]、有机小分子^[4]、蛋白质^[5]、病毒^[6]、细菌^[7],甚至整个细胞^[8].核酸适配体在靶物质的诱导下可形成特殊的空间拓扑结构.根据不同结构DNA或RNA与传感材料之间作用的不同而产生的物理、化学信号的变化,可实现对各种物质的特异性检测^[9-14].例如,富G的核酸适配体在凝血酶、K⁺等的诱导下可形成特殊的G-四链体结构^[15,16].基于这一特点,已发展了各种凝血酶检测的方法,如荧光光谱法^[17,18]、比色法^[19]、表面等离子共振法^[20,21]、电化学方法^[22,23]等.其中,荧光法由于具有较高的灵敏度而且可以同时获得多种光学信号(荧光强度、波长位移、荧光共振能量转移等)而被广泛使用.

荧光共振能量转移(Föster resonance energy transfer, FRET)是一种发生在供体和受体之间的光物理进程,当供体的荧光发射光谱与受体的吸收光谱很好重叠,并且二者之间的距离在1~10 nm范围时,供体荧光大幅度降低,受体荧光显著增强^[24].根据这种原理,可以对受体荧光信号进行放大,从而提高检测的灵敏度.

共轭聚合物(conjugated polymer, CP)是一种主链含有 π 共轭体系的新型发光材料,具有较高的摩尔消光系数和荧光量子产率,在新一代光电器件制作^[25]、太阳能电池^[26]、化学/生物传感^[27]、细胞成像、药物传输、医学诊断及治疗等领域^[28,29]具有重要的应用.特别地,水溶性共轭聚合物由于侧链含有离子型亲水基团,兼具了良好的水溶性、生物相容性及优异的光学性质,已被作为荧光共振能量转移体系的能量供体广泛使用.然而,传统的共轭聚合物侧链的电荷数量有限,在一定程度上限制了其与带相反电荷的生物分子之间的作用.分子刷型共轭聚合物是一种结构新颖的荧光传感材料,侧链带有大量高电荷密度的刷状结构.与侧链带少量电荷的线型共轭聚合物相比,显示出诸多优点,进一步拓宽了其在生物领域的应用.例如,刷状侧链产生的空间位阻效应有利于将CP的共轭主链彼此分离,从而减少了CP聚集导致的荧光猝灭,同时也减少了与非靶物质间的非特异性作用产生的信号干扰^[30,31].此外,接枝侧链具有更伸展的结构,并提供了更多的电荷,提高了CP捕获带相反电荷靶物质的能力^[32].目前,分子刷型CP已被用于生物传感^[33]、细胞成像^[34]和siRNA传递等领域^[35].

本文报道了一种基于分子刷型共轭聚合物的凝血酶检测方法,通过其与荧光染料之间的荧光共振能量转移,大大提高了检测的选择性和灵敏度,对缓冲溶液中

凝血酶检测的最低检测限可达0.05 nmol/L.

2 结果与讨论

2.1 传感原理

水溶性聚苄分子刷(PFNI)为本课题组合成的一种侧链带有大量正电荷的水溶性共轭聚合物,结构如图1所示^[36].PFNI的分子量为136800 g/mol,分子量分布系数为 $M_w/M_n=1.5$.每个苄单元带有74个正电荷.荧光量子产率为28%.

探针为15个碱基长度的凝血酶的核酸适体,末端用荧光素标记(FAM-apt15),它被凝血酶诱导形成G-四链体结构^[37-39].体系中不存在凝血酶时,带负电荷的柔性单链FAM-apt15与带正电荷的PFNI之间存在强烈的静电相互作用,使能量供体(PFNI)与受体(FAM)之间的距离较近,发生高效的荧光共振能量转移.当有凝血酶存在时,可诱导FAM-apt15形成G-四链体并与之结合形成G-四链体/凝血酶复合物.由于凝血酶为生物大分子,体积较大,且形成的G-四链体具有较强的刚性,因此会产生很大的空间位阻.同时,由于PFNI具有非常密集的分子刷状侧链,也会阻碍大体积的G-四链体/凝血酶复合物的靠近,从而使能量供体与受体之间的距离较大,二者之间能量转移效率显著降低.

图式1 阳离子型聚苄分子刷的结构式

Scheme 1 Structure of cationic brush-like conjugated poly(fluorene) derivative (PFNI)

2.2 可行性分析

能量供体发射光谱与受体吸收光谱之间的重叠是发生高效FRET的必要条件之一.为了验证该方案的可行性,对二者的光谱性质进行了研究.如图2A所示,PFNI的紫外-可见吸收峰(a)位于387 nm,荧光发射峰(b)位于418 nm.荧光素的紫外-可见吸收峰(c)位于487 nm,荧光发射峰(d)位于525 nm.表明,PFNI的发射光谱与荧光素的紫外-可见吸收光谱有一定程度的重叠,在一定条件下,二者之间可能发生有效的荧光共振能量转移(FRET).首先,初步研究了该策略检测凝血酶的可

图1 基于聚合物分子刷(PFNI)的凝血酶检测原理图

Figure 1 Schematic illustration of thrombin detection based on a conjugated polymer brush (PFNI)

行性. 如图 2B 所示, 空白体系(FAM-apt15 + PFNI)中 PFNI 的荧光发射(418 nm)很弱, 而 FAM 的荧光(525 nm)很强, 表明二者之间发生了高效的 FRET. 含有凝血酶(10 nmol/L)的体系, PFNI 的发射峰显著增强(强度为空白的 9 倍), 而 FAM 的荧光峰略有增强, FRET 效率显著降低. 归一化后空白和凝血酶的 $I_{525\text{ nm}}/I_{418\text{ nm}}$ 分别为 5.43 和 0.51.

图2 (A)PFNI 与 FAM 的紫外-可见吸收光谱(a, c)及荧光发射光谱(b, d); (B)空白(FAM-aptamer + PFNI) 和含凝血酶样品的荧光光谱图

Figure 2 (A) UV-visible spectra (a, c) and fluorescence spectra (b, d) of PFNI and FAM; (B) Fluorescence spectra of the blank (FAM-aptamer + PFNI) and the sample with thrombin

2.3 特异性分析

特异性是影响传感器性能的重要因素之一. 首先, 以牛血清蛋白(bovine serum albumin, BSA)、溶菌酶(lysozyme, Lys)和人免疫球蛋白(immunoglobulin G, IgG)为对照蛋白(浓度均为 10 nmol/L), 对凝血酶(10 nmol/L)检测的特异性进行了研究. 归一后的荧光光谱如图 3A 所示, 空白样品(a) $I_{525\text{ nm}}/I_{418\text{ nm}}$ 为 5.44, 凝血酶(e) 为 0.5, BSA(b) 和 IgG(c) 分别为 4.7 和 4.8, 而 Lys(d) 为 6.4, 与空白相比有所增强. 这是由于只有凝血酶可诱导核酸适体形成 G-四链体, 并与其结合形成 G-四链体/凝血酶复合物, 而其它对照蛋白体系中都不能形成 G-四链体结构. 由于凝血酶体积较大, 严重阻碍聚合物分子刷与荧光素之间的靠近. 另外, 由于聚合物分子刷的侧链较长而且密集, 体积较大的 G-四链体/凝血酶复合物也很难靠近共轭聚合物的发色基团(主链单元). 因此, 共轭聚合物与 G-四链体/凝血酶复合物之间的静电作用明显减弱, 能量供体与受体之间的距离较远, 体系的 FRET 效率很低, FRET 信号大大减弱. 表明该传感器对凝血酶的检测具有很好的选择性. 进一步地, 对混合蛋白体系(BSA, Lys, IgG 各 10 nmol/L)中的凝血酶进行了检测. 如图 3B 所示, 混合蛋白的 FRET 信号与空白相差很小, 而含有凝血酶的混合体系 FRET 信号显著降低, 只有空白的 23%. 表明, 该传感器具有较好的特异性和选择性, 可用于复杂体系中凝血酶的检测.

2.4 灵敏度分析

对缓冲溶液中不同浓度(0.05、0.1、0.3、0.5、1、5、10、20 nmol/L)凝血酶的检测如图 4A 和 4B 所示. 随着凝血酶浓度的增加, FRET 信号逐渐降低. 在凝血酶浓度为 0.05~1 nmol/L 范围内, 具有较好的线性关系($R^2 = 0.9799$), $I_{525\text{ nm}}/I_{418\text{ nm}}$ 显著降低. 当凝血酶浓度达到 5 nmol/L 时, FRET 信号基本达到稳定. 根据灵敏度推算的 3σ 原则, 对凝血酶检测的最低检测限可达 0.05 nmol/L. 与文献^[40~42]报道的基于共轭聚合物和荧光染料之间 FRET 的凝血酶传感器相比, 最低检测限降低了 1 个数量级. 与基于线型共轭聚合物的策略相比, 本工作和本课题组之前报道^[17]的基于分子刷型共轭聚合物的方法具有更高的灵敏度. 分析几种不同能量供体/受体之间的光谱重叠程度发现, 尽管本研究中能量供体/受体的光谱重叠程度较小, 但其能量转移效率较高, 从而提高了靶物质检测的灵敏度^[17,42]. 这可能是由于分子刷型聚合物的侧链带有大量的电荷, 其与带相反电荷的生物分子之间的静电作用更强的缘故. 进一步地, 对血清(5%)中的凝血酶(0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 nmol/L)进行了检测, 结果如图 4C 所示. 在该浓度范围内具有较好的线性关系, 对血清中凝血酶检测的最低检测限为 0.2 nmol/L.

图3 (A)归一化的各种蛋白检测荧光光谱图(a~e 分别为 blank、BSA、IgG、Lys、Throm, 均为 10 nmol/L); (B)混合蛋白体系中凝血酶检测的 FRET 信号对比图(Mix 为 BSA、IgG、Lys 三种蛋白的混合体系, 各蛋白浓度均为 10 nmol/L)

Figure 3 (A) Normalized fluorescence spectra for the detection of various proteins (a~e corresponding to the blank, BSA, IgG, Lys and Throm, each at 10 nmol/L); (B) Values of $I_{525\text{ nm}}/I_{418\text{ nm}}$ for the detection of thrombin in the mixed system (Mix is a mixture of BSA, IgG and Lys, each at 10 nmol/L)

3 结论

本文建立了一种基于分子刷 PFNI 和核酸适体的荧光传感器, 实现了对凝血酶的高灵敏度检测, 在缓冲溶液中的最低检测限为 0.05 nmol/L. 与传统的线性聚合物^[7]相比, 分子刷型共轭聚合物侧链更长更密集, 而且带有更多的电荷, 大大增强了其与带相反电荷生物分子之间的作用, 从而提高了检测的灵敏度. 分子刷型聚合物的这种新颖特点, 可进一步推广到对其它物质的检测和分析中, 为高灵敏度生物传感器的设计提供了有价值的参考依据.

4 实验部分

4.1 材料与试剂

分子刷型共轭聚合物为一种侧链带有大量正电荷的聚苄衍生物(PFNI), 根据文献[36]方法合成, 分子结构如图 1 所示, 重复单元所带正电荷平均数为 78. 使用时的浓度为聚合物重复单元的质量浓度. 凝血酶、牛血

图4 (A)不同浓度(0、0.05、0.1、0.3、0.5、1、5、10、20 nmol/L)凝血酶检测的归一化荧光光谱; (B)FRET 信号随浓度变化趋势; (C) 5%血清中不同浓度凝血酶(浓度为 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 nmol/L)检测结果

Figure 4 (A) Normalized fluorescence spectra of thrombin detection of different concentrations (0, 0.05, 0.1, 0.3, 0.5, 1, 5, 10, 20 nmol/L); (B) Relationship between $I_{525\text{ nm}}/I_{418\text{ nm}}$ and concentration of thrombin; (C) Relationship between $I_{525\text{ nm}}/I_{418\text{ nm}}$ and thrombin with different concentrations (0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 nmol/L) in the 5% diluted serum

清蛋白购自 Sigma-Aldrich 公司. 溶菌酶购自 Bio Basic Inc. 公司. 荧光素标记的 DNA 购自上海生物工程有限公司, 序列为 5'-GGTTGGTGTGGTTGG-3'. 其它化学试剂均为分析纯. 所用溶液均用 Milli-Q 水(18.2 MΩ·cm)配制. 缓冲溶液组成为 10 mmol/L Tris-HCl (pH 7.2).

4.2 仪器与设备

PekinElmer LS55 型荧光分光光度计. 测量条件为: 氙灯激发, 激发波长 380 nm, 发射波长 395~600 nm. 用 600 μL 石英比色皿进行测试, 样品体积 400 μL , 室温. PekinElmer 紫外可见分光光度计用于 DNA 浓度的定量(通过测其在 260 nm 的光吸收值)和紫外-可见吸收光谱的测试. PHS-2C 型实验室 pH 计(上海今迈)用于调节缓冲溶液的 pH. K30 干燥恒温器(奥盛仪器有限公司)用于加热.

4.3 实验过程

将 1 μL 浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 FAM-apt15 溶液加入到 5 μL 浓度为 0.8 $\mu\text{mol/L}$ 的凝血酶溶液中, 然后加入 44 μL 缓冲溶液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min. 然后加入 340 μL 缓冲溶液和 10 μL 浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 PFNI, 混匀结合 5 min. 加入比色皿中进行荧光测量. 空白样品中用等体积的水代替凝血酶.

特异性分析实验中用等体积的对照蛋白代替凝血酶. 对照蛋白的初浓度均为 0.8 $\mu\text{mol/L}$. 灵敏度分析实验中, 分别加入 5 μL 浓度分别为 0.004、0.008、0.024、0.08、0.4、0.8、1.6 $\mu\text{mol/L}$ 的凝血酶. 血清中的凝血酶检测实验中, 用含有 5% 血清的缓冲溶液代替原缓冲溶液进行反应. 所用凝血酶初浓度分别为 0.016、0.032、0.048、0.064、0.08 $\mu\text{mol/L}$. 其他实验过程与上述相同.

References

- [1] Cera, E. D.; Dang, Q. D.; Ayala, Y. M. *Cell Mol. Life Sci.* **1997**, *53*, 701.
- [2] Maragoudakis, M. E.; Tsopanoglou, N. E.; Andriopoulou, P. *Biochem. Soc. T.* **2002**, *30*, 173.
- [3] Liu, C. W.; Huang, C. C.; Chang, H. T. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 2383.
- [4] Song, W.; Zhang, Q.; Xie, X.; Zhang, S. *Biosens. Bioelectron.* **2014**, *61*, 51.
- [5] Pavlov, V.; Xiao, Y.; Shlyahovsky, B.; Willner, I. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 11768.
- [6] Liang, H. R.; Hu, G. Q.; Xue, X. H.; Li, L.; Zheng, X. X.; Gao, Y. W.; Yang, S. T.; Xia, X. Z. *Virus Res.* **2014**, *184*, 7.
- [7] Kim, Y. S.; Song, M. Y.; Jurng, J.; Kim, B. C. *Anal. Biochem.* **2013**, *436*, 22.
- [8] Cao, H. Y.; Yuan, A. H.; Shi, X. S.; Chen, W.; Miao, Y. *Oncol. Rep.* **2014**, *32*, 2054.
- [9] Song, Q. W.; Peng, M. S.; Wang, L.; He, D. C.; Ouyang, J. *Biosens. Bioelectron.* **2016**, *77*, 237.
- [10] Neves Miguel, A. D.; Blaszykowski, C.; Thompson, M. *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 3098.
- [11] Jiang, L. Y.; Xiao, X. N.; Zhou, P. L.; Zhang, P.; Yan, Y. X.; Jiang, S. X.; Chen, Q. H. *Chinese J. Anal. Chem.* **2016**, *44*, 310. (姜利英, 肖小楠, 周鹏磊, 张培, 闫艳霞, 姜素霞, 陈青华, 分析化学, **2016**, *44*, 310.)
- [12] Ge, J.; Liu, Z. F.; Zhao, X. S. *Chinese J. Chem.* **2012**, *30*, 2023.
- [13] Zhang, S. B.; Zheng, L. Y.; Hu, X.; Shen, G. Y.; Liu, X. W.; Shen, G. L.; Yu, R. Q. *Chinese J. Anal. Chem.* **2015**, *43*, 1688. (张松柏, 郑丽英, 胡霞, 沈广宇, 刘学文, 沈国励, 俞汝勤, 分析化学, **2015**, *43*, 1688.)
- [14] Wu, C.; Yang, S. Y.; Wu, Z. Y.; Shen, G. L.; Yu, R. Q. *Acta Chim. Sinica* **2013**, *71*, 367. (吴超, 杨胜园, 吴朝阳, 沈国励, 俞汝勤, 化学学报, **2013**, *71*, 367.)
- [15] He, F.; Tang, Y. L.; Wang, S.; Li, Y. L.; Zhu, D. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12343.
- [16] Chen, Z. B.; Tan, L. L.; Hu, L. Y.; Zhang, Y. M.; Wang, S. X.; Lv, F. Y. *ACS Appl. Mater. Inter.* **2016**, *8*, 102.
- [17] Liu, X. F.; Shi, L.; Hua, X. X.; Fan, Q. L.; Chao, J.; Su, S.; Huang, Y. Q.; Wang, L. H.; Huang, W. *ACS Appl. Mater. Inter.* **2015**, *7*, 16458.
- [18] Kong, L.; Xu, J.; Xu, Y.; Xiang, Y.; Yuan, R.; Chai, Y. *Biosens. Bioelectron.* **2013**, *42*, 193.
- [19] Chen, Z. B.; Tan, Y.; Zhang, C. M.; Yin, L.; Ma, H.; Ye, N. S.; Qiang, H.; Lin, Y. Q. *Biosens. Bioelectron.* **2014**, *56*, 46.
- [20] Baek, S. H.; Wark, A. W.; Lee, H. J. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 9824.
- [21] Jiang, C. N.; Liang, A. H.; Jiang, Z. L. *Acta Chim. Sinica* **2011**, *69*, 713. (蒋彩娜, 梁爱惠, 蒋治良, 化学学报, **2011**, *69*, 713.)
- [22] Le Floch, F.; Ho, H. A.; Leclerc, M. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 4727.
- [23] Zhao, J.; Hu, S. S.; Zhong, W. D.; Wu, J. G.; Shen, Z. M.; Chen, Z.; Li, G. X. *ACS Appl. Mater. Inter.* **2014**, *6*, 7070.
- [24] Liu, L. Z.; Liu, Z. H.; He, Z. K.; Cai, R. X. *Prog. Chem.* **2006**, *18*, 337.
- [25] Huang, F.; Wu, H. B.; Cao, Y. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 2500.
- [26] Wang, M.; Li, C. H.; Lv, A. F.; Wang, Z. H.; Bo, Z. S. *Macromolecules* **2012**, *45*, 3017.
- [27] Thomas, S. W.; Joly, G. D.; Swagger, T. M. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 1339.
- [28] Rochat, S.; Swagger, T. M. *ACS Appl. Mater. Inter.* **2013**, *5*, 4488.
- [29] Zhu, C. L.; Liu, L. B.; Yang, Q.; Lv, F. T.; Wang, S. *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 4687.
- [30] Wang, M. F.; Zou, S.; Guerin, G. *Macromolecules* **2008**, *41*, 6993.
- [31] Pu, K. Y.; Li, K.; Liu, B. *Adv. Funct. Mater.* **2010**, *20*, 2770.
- [32] Zhang, Z. Y.; Lu, X. M.; Fan, Q. L.; Hu, W. B.; Huang, W. *Polym. Chem.* **2011**, *2*, 2369.
- [33] Liu, X. F.; Shi, L.; Zhang, Z. Y.; Fan, Q. L.; Huang, Y. Q.; Su, S.; Fan, C. H.; Wang, L. H.; Huang, W. *Analyst* **2015**, *140*, 1842.
- [34] Hu, W. B.; Lu, X. M.; Jiang, R. C.; Fan, Q. L.; Zhao, H.; Deng, W. X.; Zhang, L.; Huang, L.; Huang, W. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 9012.
- [35] Jiang, R. C.; Lu, X. M.; Yang, M. H.; Deng, W. X.; Fan, Q. L.; Huang, W. *Biomacromolecules* **2013**, *14*, 3643.
- [36] Zhang, Z. Y. *Ph.D. Dissertation*, Nanjing University of Posts and Telecommunications, Nanjing, **2014**. (张志勇, 博士论文, 南京邮电大学, 南京, **2014**.)
- [37] Zhang, L. B.; Zhu, J. B.; Li, T.; Wang, E. K. *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 8871.
- [38] Golub, E.; Freeman, R.; Willner, I. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 12126.
- [39] Lin, Z. H.; Pan, D.; Hu, T. Y.; Liu, Z. P.; Su, X. G. *Microchim. Acta* **2015**, *182*, 1933.
- [40] Yang, X. H.; Wang, S. F.; Wang, K. M.; Luo, X. M.; Tan, W. H.; Cui, L. *Chem. J. Chinese Univ.* **2009**, *30*, 899. (羊小海, 王胜锋, 王柯敏, 罗晓明, 谭蔚泓, 崔亮, 高等学校化学学报, **2009**, *30*, 899.)
- [41] Wang, Y. Y.; Liu, B. *Langmuir* **2009**, *25*, 12787.
- [42] Liu, X. F.; Shi, L.; Hua, X. X.; Huang, Y. Q.; Su, S.; Fan, Q. L.; Wang, L. H.; Huang, W. *ACS Appl. Mater. Inter.* **2014**, *6*, 3406.

(Cheng, B.; Fan, Y.)