

基于共轲聚合物的核酸生物传感器的应用*

马 昀 周 妍 杜文琦 缪智辉 祁争健**

(东南大学化学化工学院 南京 211189)

摘 要 共轲聚合物的 π 电子体系及共轲离域结构,使其具有良好的发光性能。聚合物链可充当“分子导线”,能够成倍放大光学信号,从而有效提高检测灵敏度。而核酸适体 (aptamer) 在特异性、与靶物质亲和力、信号传导方面比其他识别元件具有更大的优势,因此共轲聚合物的核酸生物传感器在生物检测方面得到了迅速发展。本文主要总结了近年来共轲聚合物的核酸生物传感器在生物检测方面的应用,并进一步对该类型传感器的发展趋势作出了展望。

关键词 共轲聚合物 核酸适体 生物检测 荧光共振能量转移 构象变化

中图分类号:O621.3; O631.2⁺⁴; TP212 文献标识码:A 文章编号:1005-281X(2015)12-1799-09

The Application of DNA Biosensor Based on Conjugated Polymers*

Ma Yun Zhou Yan Du Wenqi Miao Zhihui Qi Zhengjian**

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Southeast University, Nanjing 211189, China)

Abstract Conjugated polymers, with π electron systems and highly delocalized conjugated structures, exhibit excellent luminescence properties. The polymer chains can work as molecular wire, which will lead to the amplification of optical signals and thus improve the detecting sensitivity. Aptamer has advantages in specificity, affinity with targets and signal transmission, hence, nucleic acid biosensors based on conjugated polymers have witnessed a rapid development in bio-detection. The applications of nucleic acid biosensors based on conjugated polymers in recent years are summarized. Finally, an outlook of the developing trend for these sensors is given.

Key words conjugated polymer; aptamer; biological detection; FRET; conformation change

Contents

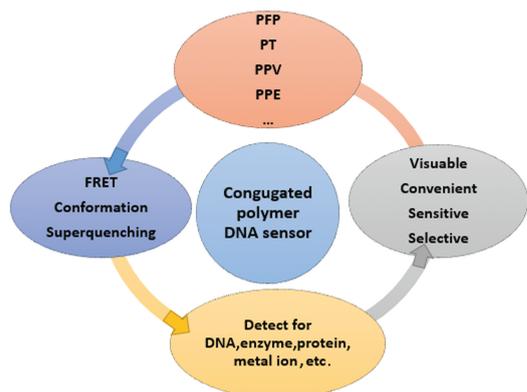
- | | |
|---|---|
| 1 Introduction | 4 Aggregation and conformation change |
| 2 The sensing mechanism of fluorescent sensor | 4.1 Detection of complementary DNA |
| 3 FRET | 4.2 Real-time monitoring of DNA hybridization |
| 3.1 Detection of complementary DNA | 4.3 Real-time monitoring of DNA structure |
| 3.2 Real-time monitoring of DNA hybridization | 4.4 Detection of enzyme |
| 3.3 Real-time monitoring of DNA structure | 4.5 Detection of specific DNA sequence |
| 3.4 Detection of protein and the activity of enzyme | 4.6 Detection of metal ion |
| 3.5 Detection of specific gene | 5 Superquenching |
| | 6 Conclusion |

收稿:2015年6月,收修改稿:2015年8月,网络出版:2015年12月11日

* 江苏省科技成果转化专项基金(No. BA2014123)和国家重大科学仪器设备开发专项(No. 2014YQ060773)资助

The work was supported by the Jiangsu Province Transformation of Scientific and Technological Achievements Program (No. BA2014123) and the National Major Scientific Instruments and Equipment Development Projects(No. 2014YQ060773).

** Corresponding author e-mail: qizhengjian@seu.edu.cn



1 引言

水溶性共轭聚合物的核酸生物传感器,由于其灵敏度高、抗磁干扰强、特异性好,引起了科学家们的广泛关注。共轭聚合物具有 π 电子的离域结构、较高的摩尔消光系数和荧光量子产率。猝灭剂结合到聚合物上任一个位点时,能量和电子可以沿着聚合物主链不断传递下去,引发相邻聚合单元或是位点荧光性能的改变,这种“分子导线”的功能导致荧光信号放大,使得共轭聚合物在生物检测方面具有非常高的灵敏度,被广泛应用于生物传感中^[1-3]。通常利用共轭聚合物构象的变化、超猝灭效应、共轭聚合物和荧光分子标记的核苷酸探针发生能量共振转移(FRET)实现检测信号的变化^[4-8]。

近年来,核酸适体(apptamer)的出现,开辟了分子生物学的新领域。核酸适体在特异性、与靶物质亲和力、信号传导方面比抗体识别元件更具有优势^[9],这为生命科学的研究建立了更为全面和详细的数据库,提供了一种全新的方法^[10-12]。所谓核酸适体,实质就是单链核酸(DNA或者RNA),一般长度在20~80个碱基左右。它们在溶液中可以形成三维多级结构,对目标物具有高度选择性和良好的亲和力。如图1所示,核酸适体一般通过体外筛选技术SELEX(systematic evolution of ligands by exponential enrichment)完成^[13]。SELEX技术为生物分析的检测提供了一个强大的数据库,还为特异性检测提供了平台。目前科学家们已经筛选出金属离子、有机染料分子、酶、抗体、多肽、核苷酸、糖类和细菌等多类物质的核酸适体,并建立了详细的数据库,为检测这些物质提供了有效的方法^[14-16]。

共轭聚合物的“分子导线”特性和核酸适体的特异性,使得这一类传感器检测灵敏度高,特异性强,响应迅速,检测结果能被肉眼观察^[17, 18]。目前

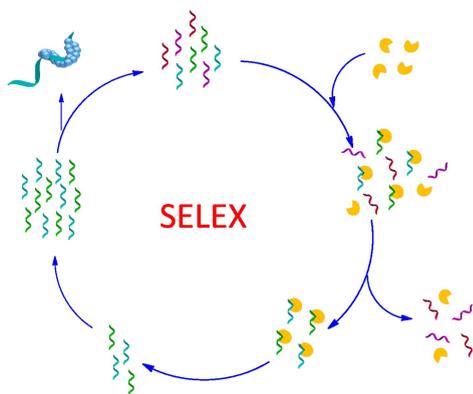


图1 体外筛选技术的过程示意图

Fig. 1 Scheme for the systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX) process

已经成功应用于检测DNA片段、酶、三磷酸腺苷(ATP)、蛋白质和金属离子等,同时还能对DNA杂化过程和酶的活性进行实时监测^[19]。

2 水溶性共轭聚合物和核酸适体的荧光传感器传感机制

对于水溶性共轭聚合物的研究目前主要涉及聚芴(PF)、聚噻吩(PT)、聚苯撑乙烯(PPV)和聚苯撑乙炔(PPE)^[17, 20, 21]。特定基团功能化的共轭聚合物含有可特异性识别生物化学分子的功能基团,如糖基、生物素、羧基、氨基酸、肽段、核酸、抗体、氨基和巯基等。在共轭聚合物侧链上修饰不同的官能团,不仅能够实现特异性的检测,还能增大体系的检测信号以提高灵敏度。目前,在经典的共轭聚合物骨架上修饰不同官能团,使其具有更好的发光性能,已经成为共轭聚合物有机合成的热点之一。

一般来说,水溶性共轭聚合物核酸适体的荧光传感器的光学传感机制有三种,第一是荧光共振能量转移(FRET),发生FRET将直接影响聚合物的荧光特性,主要以一些含有聚芴苯的共轭聚合物为代表;第二是在底物诱导下聚合物自身的构象或聚集状态发生改变,从而影响聚合物的吸收特性。通常伴有荧光的猝灭或增强,最大发射波长的红移或蓝移。这一类聚合物以含有噻吩的共轭聚合物为代表;第三是基于固相介质,利用聚合物的自组装或共价键的方式,连接到硅纳米颗粒的球形表面,由于硅纳米颗粒表面上易被固定相应的物质,当体系加入猝灭剂后,产生“超猝灭”的现象。利用体系前后荧光强度的变化实现检测。表1列出了一些代表性的共轭聚合物、合成方法和参考文献。

表 1 典型共轭聚合物的合成方法和传感机制

Table 1 Summary of synthesis and sensing mechanism of typical conjugated polymers

polymer	synthesis	mechanism	ref
PFP	Suzuki coupling	FRET	22
PFV	Heck	FRET	23
PFEP	Sonogashira	FRET	24
PPE	Sonogashira	FRET	25
PPV	Wittig, Heck	superquench, FRET	26 ~ 28
PMNT	FeCl ₃ oxidation polymerization	conformation	29 ~ 30
POWT	FeCl ₃ oxidation polymerization	conformation	31

3 基于荧光共振能量转移 (forster resonance energy transfer, FRET)

当能量供体分子 (energy donor) 的发射光谱与能量受体分子 (energy acceptor) 的激发光谱相重叠时, 供体通过偶极-偶极之间的相互作用把能量无辐射地转移给其附近的处于基态的受体, 同时供体荧光分子自身的荧光强度衰减的现象称之为荧光共振能量转移。

FRET 的效率受偶极矢量相对方向、给体与受体间距离、发射/吸收光谱重叠程度等因素影响。由于聚合物具有离域骨架和较高消光系数, 使其成为很好的能量给体, 能够放大荧光发色团 (能量受体) 的荧光信号, 使得基于 FRET 的荧光传感器具有较高的灵敏度, 从而实现低浓度检测。

按照检测类型的不同, 这一类的生物传感器分为以下几类。

3.1 检测双链 DNA 是否互补

Bazan 等^[32] 合成了侧链含有季铵离子的聚 (苄-苯撑) 结构 **P1**——聚 (9,9-双 (6'-N,N,N-三甲胺盐-己烷基)-苄亚苯基) (PFP, 最大吸收波长 380 nm), 利用 **P1** 与末端被荧光素 (fluorescein) 标记的一段核酸 (PNA) 共同组成传感体系, 基于 FRET 设计了一种实时监测 DNA 杂化并且能检测 DNA 是否互补的方法。当溶液中出现与 PNA 碱基互补的 DNA 片段时, PNA 与 DNA 杂化形成双螺旋结构并带有负电荷, 与带正电荷的 **P1** 发生静电作用拉近了荧光素与 **P1** 的距离, 进而发生荧光共振能量转移。当以聚合物的吸收波长辐射体系时, 可以观察到荧光素发出的光。若出现与 PNA 碱基不完全互补的 DNA 片段时, DNA 链与 PNA 不能完全形成双螺旋结构, 不能观察到荧光素发光。荧光素的检测信号相比 **P1** 的信号放大 15 倍, 极大地提高了检测的灵敏度, 检测下限可以达到 10 pM。

国内王树研究小组设计并合成了带有丰富侧链化学进展, 2015, 27(12): 1799 ~ 1807

结构的多种聚苄类衍生物, 如侧链上带有咪唑基团^[33]、树枝状构造^[34]、咪唑基团^[35]、冠醚环^[36]、生物素^[37]的聚苄, 并将这些聚合物应用于生物和化学传感领域, 实现了对核酸、蛋白质、生物小分子和金属离子的检测。

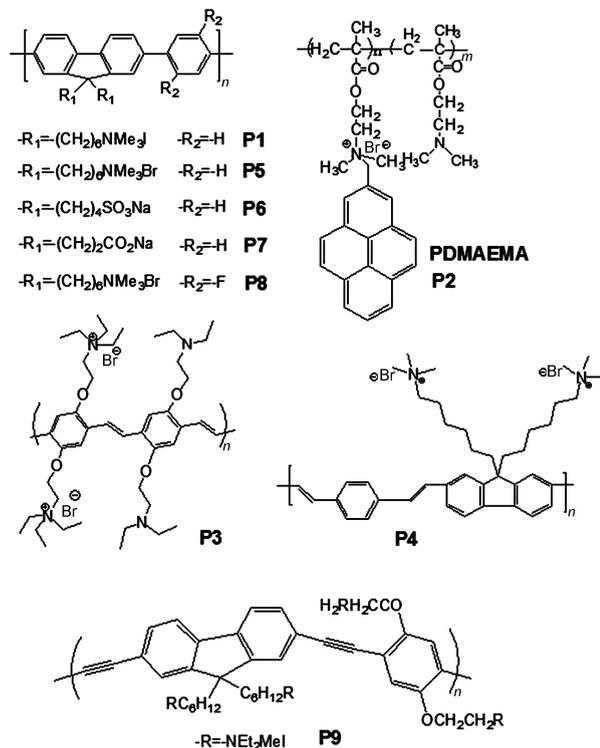


图 2 P1 ~ P9 的化学结构

Fig. 2 Chemical structures of P1 ~ P9

Wang 等^[39] 合成了含有苊的聚合物 PDMAEMA (**P2**), 并用其来检测 DNA 杂化和双链 DNA 是否互补。如图 3 所示, 荧光探针由聚合物 PDMAEMA (**P2**)、插入剂 SYBR Green I (SG I) 和 ssDNA 组成。当向体系中加入互补的 ssDNA 时, 两条 ssDNA 杂化形成双螺旋结构, SG I 能够插入双螺旋结构的凹槽中。由于静电吸引, 使得 PDMAEMA 上的苊官能团和 SG I 的距离拉近。由于苊的发射光谱和 SG I 的吸收光谱重叠, 能量从苊传递给 SG I。通过计算 FRET 的效率, 能够准确地区分完全互补的 DNA 双链和有一对碱基不互补的双链 DNA, 检测下限为 10 nM。

Cotlet 等^[40] 合成了阳离子乙烯撑苯类聚合物 PPV (**P3**), 利用 **P3** 和荧光染料 MGC (孔雀石绿) 设计的荧光探针可以通过荧光强度的大小和红移的程度, 确定双链 DNA 中含有不互补的碱基数。

3.2 实时检测 DNA 的杂化情况

Wang 等^[41] 在 PFP 的基础上, 以聚 (苄-苯撑) 的

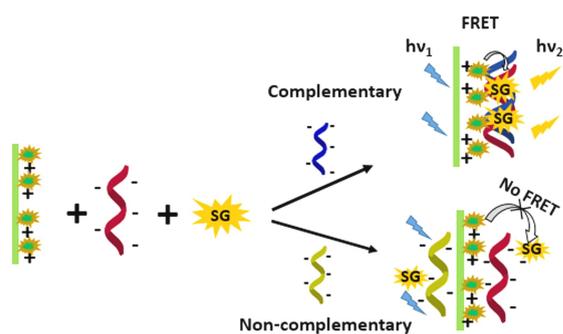


图3 通过 FRET 步骤无标记检测 DNA 杂化的荧光探针示意图

Fig. 3 Schematic representation of the fluorescent complex probe for labeling-free detection of DNA hybridization through FRET

结构为基础,引入烯烃,合成了聚合物 PFV (**P4**)。将 PFV 和荧光插入剂 EB (溴化乙锭) 联用,设计了方便简单、无标记、快速响应的实时监测 DNA 杂化的荧光探针。通过计算荧光强度在 605 nm 和 486 nm 的比值 I_{605}/I_{486} ,可推测出体系中的 dsDNA 含量。

3.3 实时监测 DNA 结构

Liu 等^[42] 基于 FRET,利用荧光插入剂噻唑橙 TO 和 **P1** 设计的荧光探针可以用来检测双链 DNA。TO 在未与核酸结合前不发光,检测无背景干扰。但是当其与 dsDNA 结合后,荧光强度增大 1000 倍以上。通过肉眼可以检测出血浆中的 dsDNA,浓度范围为 1.2 ~ 6.0 nM。

Wang 等^[43] 基于 FRET,将 **P5** 应用在 DNA 特定序列的高灵敏度检测中。此种方法能够检测 DNA 的茎环结构和 DNA 双螺旋结构,还能检测出有碱基不互补的 DNA 序列。

3.4 对蛋白质和酶活性的检测

Tang 等^[44] 利用 **P5**、茎环状核酸适体和荧光插入剂 EB,设计了含有两步 FRET 的荧光探针,用来特异性地检测腺苷脱氨酶 ADA。带正电荷 **P5** 和 DNA 互补链上的荧光基团 FAM 之间发生 FRET,发出绿光,此时插入剂 EB 不发出荧光。在加入 ADA 的情况下,腺苷会被水解成为肌苷,同时原来茎环状核酸适体变成无规则卷曲状的 ssDNA,与末端含有荧光基团的 DNA 互补链杂化,形成双螺旋结构,EB 可以插入到 DNA 双螺旋结构的凹槽中。**P5** 作为能量供体先将能量传递给荧光基团 FAM,再由 FAM 传递给 EB,所以溶液中呈现出亮黄色,如图 4(a) 所示。这种含有两步 FRET 检测腺苷脱氨酶的方法无

需特殊处理,简单方便,耗时仅需 25 min,检测下限达到 0.5 U/L。

随后,Tang 等^[45] 利用 **P5** 和茎环状核酸适体,又以 FRET 和 PET 为传感机制,设计了一种灵敏度更高、选择性好的检测腺苷脱氨酶(ADA)的方法。核酸适体在 3'端有 3 个鸟嘌呤,在 5'端标记的荧光基团 FAM 的荧光可以被这 3 个鸟嘌呤猝灭。**P5** 和荧光基团 FAM 之间发生 FRET 的效率很低。向体系加入 ADA 后,此时茎环状核酸适体变成无规则卷曲状的 ssDNA,**P5** 和 ssDNA 上连接的荧光基团 FAM 发生 FRET 的效率大大增加,溶液发出明亮的绿光,如图 4(b) 所示。此种方法检测 ADA 的下限是 0.3 U/L。

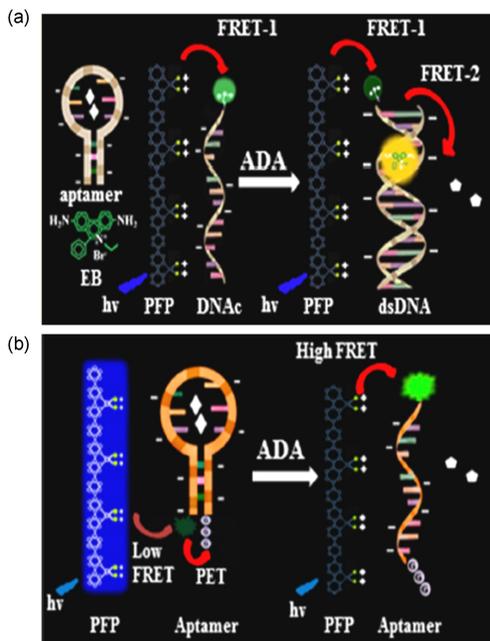


图4 水溶性共轭聚合物用作检测腺苷脱氨酶的平台:(a)含有两步 FRET^[44]; (b)含有一步 FRET^[45]

Fig. 4 Water-soluble conjugated polymer as a platform for adenosine deaminase detection: (a) two steps of FRET^[44] and (b) one step of FRET^[45]

Lian 等^[46] 利用 **P5** 来检测 T4 多核苷酸激酶。无标记的茎环状 DNA 的 5'端是 T4 多核苷酸激酶的作用位点。如图 5 所示,SYBR Green I 作为插入剂,可以插入茎环状 DNA 的茎状区域。当加入 **P5** 时,由于静电吸引作用,茎环状 DNA 和 **P5** 的距离减小,导致 **P5** 和 SYBR Green I 染料之间距离足够近,能够发生 FRET。在 T4 多核苷酸激酶作用下,茎环状 DNA 的 5'端将发生磷酸化作用产生裂口,变成无规则卷曲状的 DNA,SYBR Green I 染料无法插入到

DNA 中,不能发生 FRET。通过计算 FRET 效率,可以推断 T4 多核苷酸脱氢酶的活性。

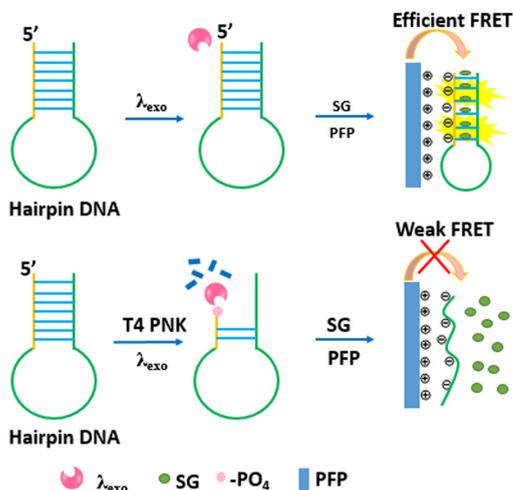


图 5 PFP 用作 T4 多核苷酸激酶检测的原理示意图

Fig. 5 Schematic representation of the PFP-based T4 PNK assay

Liu 等^[47]利用阴离子聚合物 **P6**, 基于 FRET 设计了检测溶菌酶的荧光探针。随后他们通过 Suzuki 偶联合成了羧酸盐的 PFP 结构 (PFP-CO₂Na, **P7**)^[48], 用来检测胰蛋白酶的活性, 且检测下限为 1.7 nM。此外, 他们还利用聚合物 **P8**, 基于 FRET 设计了能在硅纳米颗粒上检测酶和免疫球蛋白 G (抗体) 的荧光探针^[49, 50]。如图 6 所示, 凝血酶核酸适体易被固定在硅纳米颗粒的球形表面上, 结合相应的凝血酶, 形成“夹心”(sandwich) 结构。这种结构能够特异性识别体系中另一个凝血酶核酸适体 (被荧光素标记), 从而拉近了聚合物和荧光素标记的凝血酶核酸适体之间的距离, 使之能够发生 FRET, 造成荧光信号的放大。此种方法对凝血酶的检测下限为 1.06 nM, 对球形免疫蛋白 IgG 的检测下限为 50 ng/mL。

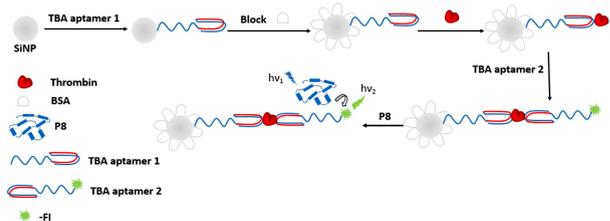


图 6 利用二氧化硅纳米颗粒检测凝血酶的原理图

Fig. 6 Schematic representation of thrombin detection based on silica nanoparticles

3.5 对特定基因的检测

Huang 等^[51]合成了含有苋和炔烃的阳离子共轭聚合物 PFEP (**P9**), 利用连有羧基荧光基团的糖胺聚糖 (FA-HA, 能量受体), 设计了一种可视化检测 CD44 基因片段的方法。在 PFEP 溶液 (阳离子) 中加入末端连有羧基荧光基团的糖胺聚糖 (阴离子), 体系发生 FRET, 溶液由蓝色变为绿色。过度表达的 CD44 基因会导致细胞癌变, 易和糖胺聚糖发生特异性结合, 发生 FRET 效率降低, 溶液中呈现 PFEP 的蓝色, 此种方法的检测下限是 2.3×10^{-8} g/mL。

4 基于构象变化

构象与聚集状态是物质分子在溶液中的物理行为, 处于不同的聚集状态会展现不同的光谱特征。聚合物链间的聚集会导致其浓度增加, 自身荧光发生猝灭。聚合物链还会随所处的环境的变化呈现出不同的构象, 从而影响其光学特性。这是因为聚合物的有效共轭长度因构象改变发生了变化, 具体表现为吸收峰的红移或蓝移, 荧光发射强度的猝灭与恢复等。对构象敏感的聚合物可通过肉眼直接观察到颜色变化, 从而应用到可视化的生物传感中。

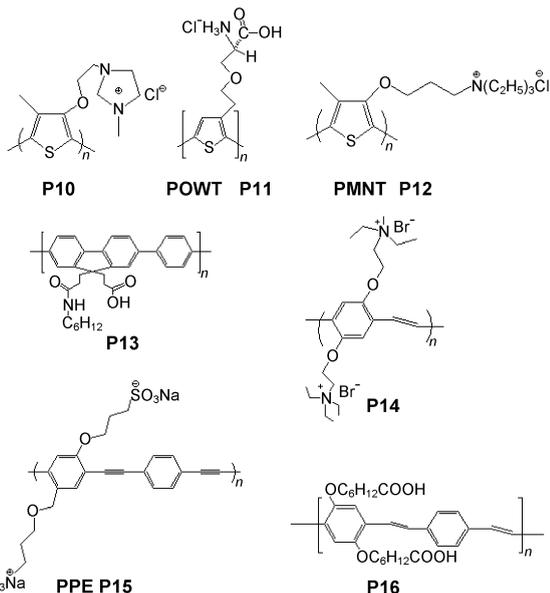


图 7 P10 ~ P16 的化学结构式

Fig. 7 Chemical structures of P10 ~ P16

Leclerc 课题组^[31]于 2002 年报道了阳离子聚噻吩衍生物 **P10** 用作无标记、高灵敏、高选择性地检测 DNA 后, 聚噻吩衍生物被广泛应用于生物传感中, 目前已经报道用于酶^[52]、肝素^[53]、多硫软骨素^[54~56]、代谢相关物质^[57~59]、纤维素^[60]、大肠杆菌^[61]、链霉素^[62]等物质的检测。聚合物和待测物

之间主要靠静电吸引和 π - π 堆叠作用结合在一起。通常基于构象变化的核酸生物传感器的应用,分为以下几类。

4.1 检测 DNA 是否互补

He 等^[63]将 **P10** 用于检测含有禽流感病毒的 DNA 序列。该法能够快速检测出互补链中含有不互补碱基的 DNA,灵敏度达到 10^{-10} M。

近期,Qi 等^[64]将侧链含有两性基团的聚噻吩衍生物 POWT (**P11**),应用于检测乳腺癌相关的基因 *BRCA1* 和 *TB4*,构建的生物探针最低能够区分一个碱基不互补的 DNA 序列,且对于 *BRCA1* (46bp) 和 *TB4* 基因片段(40bp)的检测下限分别达到 2.231 pM 和 2.659 pM。如图 8(a) 所示,当 POWT 与 ssDNA 结合后,由于静电吸引,POWT 链间聚集,构象趋于平面化,最大吸收波长红移。在聚集过程中,POWT 浓度升高,自吸收效应导致荧光强度降低。向体系中加入互补的 ssDNA 后,两条 ssDNA 杂化,使得 POWT 分子释放,体系荧光强度恢复,POWT 构象趋于非平面化,最大吸收波长蓝移。若向体系中加入含有 1~3 个碱基不互补的 ssDNA,荧光强度只能部分恢复,且不互补的碱基越多,荧光强度恢复率

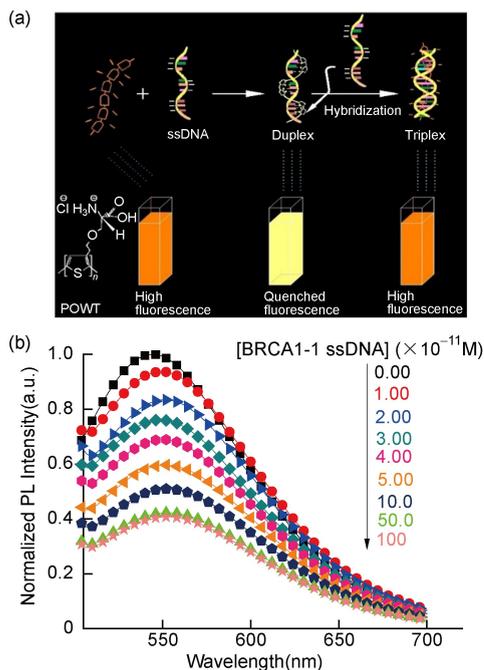


图 8 (a) POWT 应用在 DNA 检测的原理示意图; (b) POWT 溶液中加入不同浓度 *BRCA1*-1 ssDNA 后的荧光发射光谱图

Fig. 8 (a) Schematic representation of POWT for ssDNA detection. (b) PL spectra of POWT in solutions with the addition of *BRCA1*-1 ssDNA in different concentrations

越低。这种检测方法无需标记、响应迅速、生物相容性好、灵敏度高,将有可能运用于临床检测 *BRCA1* 和 *TB4* 基因的突变。

4.2 实时监测 DNA 杂化

Li 等^[65]利用聚噻吩衍生物 PMNT (**P12**)设计了一种无标记检测 DNA 杂化的探针。在弱碱性条件下,PMNT 对鲁米诺-过氧化氢化学发光反应具有强增敏效应。由于 PMNT 与单链 DNA 作用后形成的复合物 (PMNT/ssDNA) 对发光体系的增敏程度高于 PMNT 与双链 DNA 作用后形成的复合物 (PMNT/dsDNA),所以这种无需标记、均相体系、借助化学发光的方法可以用来实时监测 DNA 杂化。实验结果表明该体系的化学发光强度与目标 DNA 浓度在 0.001~0.1 nM 范围内呈良好的线性关系,检测下限为 3.7×10^{-13} M。

4.3 检测 DNA 的结构

Huang 等^[66]利用聚噻吩衍生物 PMNT (**P12**)实时监测 pH 引起的 DNA 的 i-motif 结构和无规则卷曲结构相互转变的过程。当 pH 值小于 6.5 时, DNA 形成 i-motif 结构,由于静电吸引作用与带阳离子的 PMNT 结合形成 PMNT/i-motif 复合物,溶液呈现黄色。当 pH 值小于 6.5 时,ssDNA 具有 i-motif 结构,PMNT 包裹在 i-motif 结构的表面,PMNT 聚集,由于 π - π 键的堆叠,有效共轭长度增加,溶液呈现红色,荧光强度猝灭,能被肉眼直接观察到。若 pH 值大于 6.5 时,ssDNA 具有无规则卷曲状。此时加入互补的 ssDNA,两条无规则卷曲线状的 ssDNA 可以杂化形成 dsDNA,使得 PMNT 的荧光重新恢复。Xu 的团队^[67]也报告了 PMNT 的类似研究成果。

4.4 对酶的检测

Leclerc 等^[68]发现聚噻吩衍生物 **P10** 能够用来检测 α 凝血酶。**P10** 在溶液中呈现黄色。如图 9 所示,当向含有 α 凝血酶核酸适体的溶液中加入 α 凝血酶后,体系中原有的 α 凝血酶核酸适体形成紧密的 G 四聚体结构。此时加入聚合物 **P10**,聚合物会包裹在核酸适体表面,阻碍了聚合物链间的聚集,溶液呈现橘黄色。而加入其他蛋白质(如小牛血清白蛋白 BSA)后, α 凝血酶适体仍然为无规则卷曲状,和 **P10** 形成 duplex,造成聚合物链间的聚集,荧光强度减小,最大吸收波长红移,溶液由黄色变成红紫色。这种变化过程能由肉眼观察到,可以用来检测 α 凝血酶。Xia 等^[69]则利用 **P13** 以及端粒酶特定的核酸适体序列 5'-AATCCGTCGAGCAGAGTT-3' 实现了对端粒酶的检测。

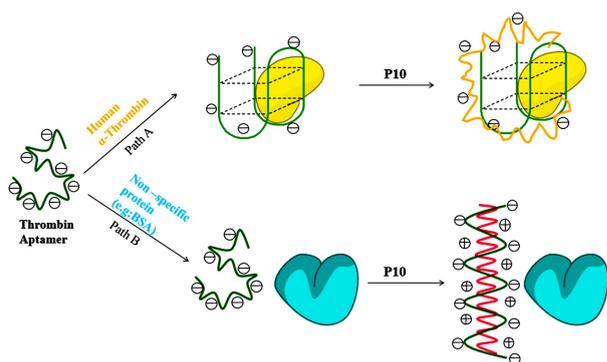


图9 利用 P10 和凝血酶 ss-DNA 检测 α 凝血酶的原理示意图

Fig. 9 Schematic representation of the specific detection of human α -thrombin by use of ss-DNA thrombin aptamer and cationic polymer P10

4.5 对特定序列的 DNA 的检测

Cotlet 等^[70]合成含有乙烯撑苯的聚合物 P14, 利用 DNA 与聚合物结合后的构象变化,研究了其中的机理。在 P14 中加入 G 富集的 DNA 序列(易形成二级结构),由于 π - π 键的堆叠,荧光强度下降,最大发射波长红移 18 nm。而其他四种 DNA 序列与 P14 结合后,荧光强度增加,最大发射波长红移 38 ~ 58 nm 不等,通过此种方法可以识别出特定序列的 DNA 序列。

4.6 对金属离子的检测

Tang 等^[71]利用聚合物 P1 和氧化石墨烯 GO,设计了可以检测 K^+ 的荧光探针。若体系中没有 K^+ ,被荧光素基团标记的 DNA 序列 5'-GGTTGGTGTGGTTGG-3' 的荧光被 GO 大量猝灭,此时向体系中加入 P1,体系几乎不发生 FRET。若体系中有 K^+ ,上述 DNA 序列易形成 G-四链体结构,与 GO 距离疏远,而 P1 和荧光素由于静电吸引,距离拉近,发生 FRET 效率增加,检测信号变大,且伴随着发射峰的移动,此种方法的检测下限是 0.03 μ M。

Wang 等^[72]利用聚噻吩衍生物 PMNT(P12)和碱基 T 富集的 DNA 探针 MSO(无规则卷曲状),用来检测 Hg^{2+} 。如图 10 所示,PMNT 溶液呈现黄色,向溶液中加入探针 MSO 后,DNA 和 PMNT 由于静电吸引,造成 PMNT 链间聚集,溶液呈现红色。若体系中含有 Hg^{2+} ,MSO 在 Hg^{2+} 诱导下,容易形成茎环结构,而 Hg^{2+} 在茎环结构的平行部分排列,形成 T- Hg^{2+} -T 的三层结构,此时聚合物 PMNT 包裹在茎环结构的 DNA 周围,溶液重新恢复黄色。这种可视化检测 Hg^{2+} 的方法,检测下限为 42 nM。他们^[72]还报

道了利用聚合物 P14 选择性检测 Ag^+ 的方法,检测下限达到 0.5 μ M。

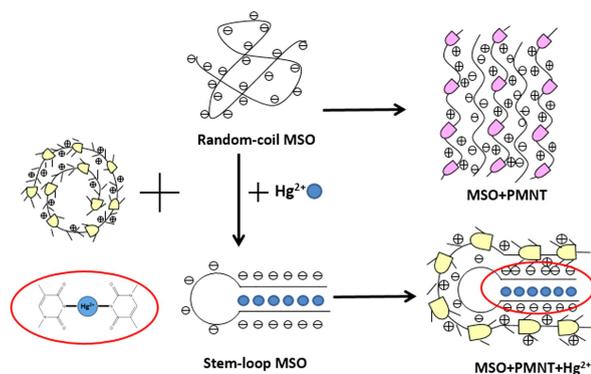


图10 利用 PMNT 和 MSO 的构象变化来检测 Hg^{2+} 的机理

Fig. 10 Schematic representation of the optical mercury sensing mechanism, based on a target induced conformational change of MSO and a resultant optical change of PMNT

5 基于超猝灭效应

所谓超猝灭效应,是指共轭聚合物的荧光强度被极大地猝灭,若采用斯特恩方程拟合,得到的 K_{SV} 近 $10^{11} M^{-1}$,比普通猝灭模式的 K_{SV} 高很多^[74]。研究发现,聚合物以共价键或是自组装的方式,接到微球表面上。加入待测物后,由于待测物上通常连有猝灭剂,可以使得聚合物的荧光被大量猝灭,利用前后荧光强度的变化,可以达到快速灵敏的检测^[75-77]。

Kushon 等^[78]提出了在微球表面上检测 DNA 的新体系,将发光聚合物 PPE(P15)固定在微球表面,实现了对炭疽热病毒相关 DNA 序列的检测。Travas 等^[79, 80]在氧化铁磁性微球上包裹了二氧化硅,聚合物 P16 以共价键方式结合在磁性颗粒上,构成了 PBEH-MagSi 复合体。在 P16 表面上固定了俘获探针 CapODNs,根据 DNA 探针上染料 cy3 连接位置的不同,体系会产生两种光学效应,即荧光增强(FRET, switch on)和荧光超猝灭(superquenching, switch off)。他们基于 switch on 模式,设计了检测双链 DNA 是否互补的方法。如图 11 所示,若探针 DNA 与 CapODNs 完全互补,两条 ssDNA 杂化,PPV 和 cy3 距离靠近,则 PPV 作为能量供体可以将能量传递给受体 cy3,发生有效的 FRET。若探针 DNA 与 CapODNs 有碱基对不互补,则两条 ssDNA 不能完全杂化,发生 FRET 的效率降低。通过计算 FRET

的效率,就可以判断体系中含有不互补碱基的数量。

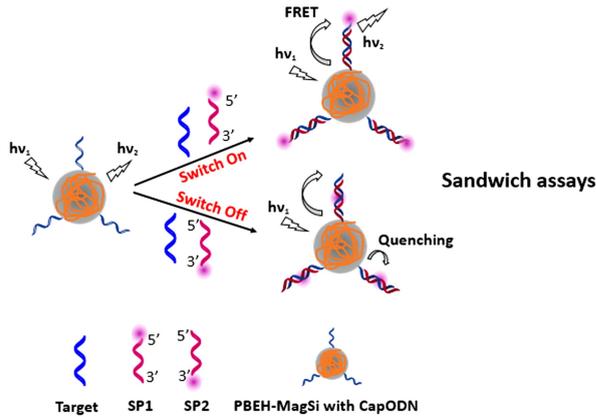


图 11 利用 FRET 和超猝灭检测 DNA 的原理

Fig. 11 Schematic representation of DNA detection systems based on two different routes, namely FRET and superquenching

6 结论

本文对近年来荧光共轭聚合物的核酸生物传感器的应用进行了概括。荧光共轭聚合物具有倍增光学响应性,可放大荧光传感信号。而核酸适体,由于选择特异性高,亲和力好,使得特异性检测成为可能,为生物检测提供了广阔的平台。利用共轭聚合物作为探针从多角度深入研究传感器的应用,已经成为环境检测、临床医学、疾病诊断和基因突变等方面的热点。目前已经成功应用于检测双链 DNA 是否互补、DNA 结构、蛋白质、酶、特定基因、小分子,同时还能用来实时监测 DNA 杂化情况、酶的活性等等。由于检测的特异性取决于传感器中核酸适体的具体核酸序列,为了扩大检测范围,必须确定不同的核酸适体序列,以达到多样化检测的目的。这也成为研究的热点和难点之一。未来,人们将不断拓宽检测的范围,同时提高检测的灵敏度,对共轭聚合物的核酸生物传感器的研究也将不断深入到各个方面,从而带来特异性强、灵敏高、响应迅速和操作简单的检测方法。

参考文献

- [1] Gaylord B S, Heeger A J, Bazan G C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2002, 99(17): 10954.
- [2] Liu Y, Ogawa K, Schanze K S. *J. Photoch. Photobio. C*, 2009, 10(4): 173.
- [3] McQuade D T, Pullen A E, Swager T M. *Chem. Rev.*, 2000, 100(7): 2537.
- [4] Burrezo P M, Pelado B, Ortiz R P, De la Cruz P, Navarrete J T, Langa F, Casado J. *Chem. Eur. J.*, 2015, 21(4): 1713.
- [5] Farcas A, Aubert P H, Mohanty J, Lazar A I, Cantin S, Nau W M. *Eur. Polym. J.*, 2015, 62: 124.
- [6] Farcas A, Resmerita A M, Aubert P H, Ghosh I, Cantin S, Nau W M. *Macromol. Chem. Phys.*, 2015, 216(6): 662.
- [7] Ghosh D, Chattopadhyay N. *J. Lumin.*, 2015, 160: 223.
- [8] Li P L, Di Stasio F, Eda G, Fenwick O, McDonnell S O, Anderson H L, Chhowalla M, Cacialli F. *ChemPhysChem*, 2015, 16(6): 1258.
- [9] Bunka D H J, Stockley P G. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2006, 4(8): 588.
- [10] Bigwood D W, Heller S R, Wolf W R, Schubert A, Holden J M. *Anal. Chim. Acta*, 1987, 200(1): 411.
- [11] Gold L. *Harvey lectures*, 1995, 91: 47.
- [12] Jayasena S D. *Clin. Chem.*, 1999, 45(9): 1628.
- [13] Klug S J, Famulok M. *Mol. Biol. Rep.*, 1994, 20(2): 97.
- [14] Liu X F, Fan Q L, Huang W. *Biosens. Bioelectron.*, 2011, 26(5): 2154.
- [15] Huang Y Q, Fan Q L, Zhang G W, Chen Y, Lu X M, Huang W. *Polymer*, 2006, 47(15): 5233.
- [16] Li J, Huang Y Q, Qin W S, Liu X F, Huang W. *Polymer Chemistry*, 2011, 2(6): 1341.
- [17] Lan M H, Liu W M, Wang Y, Ge J C, Wu J S, Zhang H Y, Chen J H, Zhang W J, Wang P F. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2013, 5(6): 2283.
- [18] 支俊格(Zhi J G), 徐秀玲(Xu X L), 申进波(Shen J B), 赵玮(Zhao W), 佟斌(Tong B), 董宇平(Dong Y P). *化学进展(Prog. Chem.)*, 2009, (04): 739.
- [19] Liu R X, Tan Y, Zhang C L, Wu J T, Mei L, Jiang Y Y, Tan C Y. *J. Mater. Chem. B*, 2013, 1(10): 1402.
- [20] 黄艳琴(Huang Y Q), 范曲立(Fan Q L), 黄维(Huang W). *化学进展(Prog. Chem.)*, 2008, (04): 574.
- [21] 汪凌云(Wang L Y), 曹德榕(Cao D R). *化学进展(Prog. Chem.)*, 2010, (05): 905.
- [22] Liu B, Wang S, Bazan G C, Mikhailovsky A. *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, 125(44): 13306.
- [23] Hwang D H, Lee J D, Kang J M, Lee S, Lee C H, Jin S H. *J. Mater. Chem.*, 2003, 13(7): 1540.
- [24] Huang Y Q, Fan Q L, Lu X M, Fang C, Liu S J, Yu-Wen L H, Wang L H, Huang W. *Journal of Polymer Science Part A-Polymer Chemistry*, 2006, 44(19): 5778.
- [25] Bumagin N A, Sukhomlinova L I, Luzikova E V, Tolstaya T P, Beletskaya I P. *Tetrahedron. Lett.*, 1996, 37(6): 897.
- [26] Liang Z, Cabarcos O M, Allara D L, Wang Q. *Adv. Mater.*, 2004, 16(9/10): 823.
- [27] Furukawa Y, Cha Y H, Noguchi T, Ohnishi T, Tasumi M. *Journal of Molecular Structure*, 2000, 521: 211.
- [28] Sakaguchi T, Sato M, Hashimoto T. *Polymer*, 2013, 54(9): 2272.
- [29] Herland A, Nilsson K P R, Olsson J D M, Hammarstrom P, Konradsson P, Inganas O. *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, 127(7): 2317.

- [30] Nilsson K P R, Olsson J D M, Stabo-Eeg F, Lindgren M, Konradsson P, Inganas O. *Macromolecules*, 2005, 38(16): 6813.
- [31] Ho H A, Boissinot M, Bergeron M G, Corbeil G, Dore K, Boudreau D, Leclerc M. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2002, 41(9): 1548.
- [32] Gaylord B S, Heeger A J, Bazan G C. *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, 125(4): 896.
- [33] He F, Tang Y L, Yu M H, Wang S, Li Y L, Zhu D B. *Adv. Funct. Mater.*, 2007, 17(6): 996.
- [34] Yu M H, Tang Y L, He F, Wang S, Zheng D G, Li Y H, Zhu D B. *Macromol. Rapid Commun.*, 2006, 27(20): 1739.
- [35] Xing C F, Yu M H, Wang S, Shi Z Q, Li Y L, Zhu D B. *Macromol. Rapid Commun.*, 2007, 28(3): 241.
- [36] Yu M H, He F, Tang Y, Wang S, Li Y L, Zhu D B. *Macromol. Rapid Commun.*, 2007, 28(12): 1333.
- [37] An L L, Tang Y L, Wang S, Li Y L, Zhu D B. *Macromol. Rapid Commun.*, 2006, 27(13): 993.
- [38] Duan X R, Li Z P, He F, Wang S. *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, 129(14): 4154.
- [39] Zhou R Y, Xu C, Dong J, Wang G J. *Biosens. Bioelectron.*, 2015, 65: 103.
- [40] Liu Z W, Wang H L, Cotlet M. *Chem. Mater.*, 2014, 26(9): 2900.
- [41] Wang B, Yang Q, Liu L B, Wang S. *Colloid Surf. B-Biointerfaces*, 2011, 85(1): 8.
- [42] Pu K Y, Liu B. *Adv. Funct. Mater.*, 2009, 19(9): 1371.
- [43] Feng X L, Duan X R, Liu L B, An L L, Feng F D, Wang S. *Langmuir*, 2008, 24(21): 12138.
- [44] Wang C, Tang Y L, Liu Y, Guo Y. *Anal. Chem.*, 2014, 86(13): 6433.
- [45] Wang C, Tang Y L, Guo Y. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2014, 6(23): 21686.
- [46] Lian S, Liu C H, Zhang X B, Wang H H, Li Z P. *Biosens. Bioelectron.*, 2015, 66: 316.
- [47] Wang J, Liu B. *Chem. Commun.*, 2009, (17): 2284.
- [48] Wang Y Y, Zhang Y, Liu B. *Anal. Chem.*, 2010, 82(20): 8604.
- [49] Wang Y Y, Liu B. *Biosens. Bioelectron.*, 2009, 24(11): 3293.
- [50] Wang Y Y, Liu B. *Langmuir*, 2009, 25(21): 12787.
- [51] Huang Y Q, Yao X, Zhang R, Lang O Y, Jiang R C, Liu X F, Song C X, Zhang G W, Fan Q L, Wang L H, Huang W. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2014, 6(21): 19144.
- [52] An L L, Liu L B, Wang S. *Biomacromolecules*, 2009, 10(2): 454.
- [53] Zhan R Y, Fang Z, Liu B. *Anal. Chem.*, 2010, 82(4): 1326.
- [54] Sommers C D, Keire D A. *Anal. Chem.*, 2011, 83(18): 7102.
- [55] Sommers C D, Mans D J, Mecker L C, Keire D A. *Anal. Chem.*, 2011, 83(9): 3422.
- [56] Sommers C D, Ye H P, Kolinski R E, Nasr M, Buhse L F, Al-Hakim A, Keire D A. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2011, 401(8): 2445.
- [57] Lan M H, Wu J S, Liu W M, Zhang W J, Ge J C, Zhang H Y, Sun J Y, Zhao W W, Wang P F. *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, 134(15): 6685.
- [58] Guo Y Q, Chen Y X, Wei Y L, Li H H, Dong C. *Spectrochim. Acta*, 2015, 136: 1635.
- [59] Li C, Numata M, Takeuchi M, Shinkai S. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2005, 44(39): 6371.
- [60] Nilsson K P R, Herland A, Hammarstrom P, Inganas O. *Biochemistry*, 2005, 44(10): 3718.
- [61] Plante M P, Berube E, Bissonnette L, Bergeron M G, Leclerc M. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2013, 5(11): 4544.
- [62] Lan M H, Liu W M, Ge J C, Wu J S, Sun J Y, Zhang W J, Wang P F. *Spectrochim. Acta*, 2015, 136: 871.
- [63] Guan H L, Zhou P, Zeng S, Zhou X L, Wang Y, He Z K. *Talanta*, 2009, 79(2): 153.
- [64] Ma Y, Xia Y, Yan L Q, Wang F, Miao Z H, Cui M F, Yao H T, Qi Z J. *Anal. Methods*, 2015, 7: 5814.
- [65] Liu M, Li B X, Cui X. *Biosens. Bioelectron.*, 2013, 47: 26.
- [66] Wang L H, Liu X F, Yang Q, Fan Q L, Song S P, Fan C H, Huang W. *Biosens. Bioelectron.*, 2010, 25(7): 1838.
- [67] Ren X S, He F, Xu Q H. *Asian J. Chem.*, 2010, 5(5): 1094.
- [68] Ho H A, Leclerc M. *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, 126(5): 1384.
- [69] Jia Y M, Zuo X L, Lou X D, Miao M, Cheng Y, Min X H, Li X C, Xia F. *Anal. Chem.*, 2015, 87(7): 3890.
- [70] Liu Z, Wang H L, Cotlet M. *Chem. Commun.*, 2014, 50(77): 11311.
- [71] Xing X J, Zhou Y, Liu X G, Tang H W, Pang D W. *Analyst*, 2013, 138(21): 6301.
- [72] Liu X F, Tang Y L, Wang L H, Zhang J, Song S P, Fan C H, Wang S. *Adv. Mater.*, 2007, 19(13): 1662.
- [73] Qin C J, Wong W Y, Wang L X. *Macromolecules*, 2011, 44(3): 483.
- [74] Fan C H, Wang S, Hong J W, Bazan G C, Plaxco K W, Heeger A J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2003, 100(11): 6297.
- [75] Jones R M, Lu L D, Helgeson R, Bergstedt T S, McBranch D W, Whitten D G. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2001, 98(26): 14769.
- [76] Lu L D, Helgeson R, Jones R M, McBranch D, Whitten D. *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, 124(3): 483.
- [77] Lu L D, Jones R M, McBranch D, Whitten D. *Langmuir*, 2002, 18(20): 7706.
- [78] Kushon S A, Bradford K, Marin V, Suhrada C, Armitage B A, McBranch D, Whitten D. *Langmuir*, 2003, 19(16): 6456.
- [79] Srinivas A R G, Peng H, Barker D, Travas-Sejdic J. *Biosens. Bioelectron.*, 2012, 35(1): 498.
- [80] Srinivas A R G, Barker D, Travas-Sejdic J. *Int. J. Nanotechnol.*, 2014, 11(5/8): 645.