基于水溶性共轭聚合物的多色荧光体系的构建及生物医学应用

王凤燕^{①②}, 王晓瑜^②, 李盛亮^②, 刘礼兵^{②*}, 吕凤婷^②, 王树^{②*}

① 长安大学材料科学与工程学院, 西安 710064

② 中国科学院化学研究所有机固体重点实验室, 北京 100190

*通讯作者, E-mail: liulibing@iccas.ac.cn; wangshu@iccas.ac.cn

收稿日期: 2015-07-14; 接受日期: 2015-07-30; 网络版发表日期: 2015-10-12

doi: 10.1360/N032015-00123

摘要 共轭聚合物(CPs)具有强的光捕获能力和独特的荧光信号放大效应, 已经被广泛地用于生物大分子的检测以及细胞及动物水平上的荧光成像. 在过去的十几年里, 为了满足多色荧光检测及成像的需要, 科研工作者设计并发展了一系列基于共轭聚合物的荧光共振能量转移(CPs-FRET)的多色荧光体系. 这类多色荧光体系具有荧光强度高、光稳定性好以及细胞毒性低的优点. 利用这类体系在单波长的激发光激发下即可实现目标分子的多色荧光检测及多色荧光成像. 本文阐述了 CPs 的 FRET 机制以及基于 CPs-FRET 的多色荧光体系的构建方法, 同时介绍了近期这类体系在生化检测和细胞成像领域中的研究进展以及目前所存在的问题和未来的发展展望.

关键词

水溶性共轭聚合物
荧光共振能量转移
多色荧光体系
生化检测
细胞成像

1 引言

共轭聚合物(CPs)具有强的光捕获能力和独特的荧光信号放大效应, 已经被广泛地用于生物、化学传感及材料学等领域. 在过去的十几年间, 科研工作者通过在侧链引入离子基团设计合成了新型的水溶性 CPs. 离子型基团的引入使得 CPs 具有一定的电荷特性, 能够与带相反电荷的物种通过静电相互作用结合, 形成稳定的聚电解质复合物, 因此其作为荧光探针在目标分子(DNA、蛋白质及小分子等)的检测方面受到越来越多的重视^[1~4]. 此外, 由于共轭聚合物具有量子产率高、光稳定性好、细胞毒性低及侧链易修饰的优点, 科研工作者还将水溶性 CPs 用于细胞及动物水平上的荧光成像, 并取得了诸多优秀的研究成果^[5~8]. 然而, 早期的研究工作主要集中在利用单一吸收或发射光谱范围内的光学信号来实现目标分子

的检测或荧光成像. 这种只收集单一光谱范围内的光学信号的单通道检测和成像方法并不能满足多色传感及荧光成像的需要. 最近, 科研工作者设计并发展了许多基于共轭聚合物的荧光共振能量转移(CPs-FRET)的多色荧光体系, 利用这类体系在单波长的激发光激发下即可实现目标分子的多色荧光检测及多色荧光成像^[9~13]. 这些多色荧光编码现象能够通过荧光光谱区分开, 甚至仅需紫外灯就能够可视区分, 为 CPs 在疾病诊断及荧光成像方面的应用奠定了良好的基础. 为了有利于科研工作者开发新型的基于 CPs-FRET 的多色荧光体系并进一步拓展它们在生物医学领域中的应用, 有必要详尽综述此类体系的研究进展. 本文简单介绍了 CPs 的 FRET 机制, 并深入阐述了基于 CPs-FRET 的多色荧光体系的构建方法及其在生化检测及细胞成像领域中的应用研究.

2 CPs 的 FRET 机制

荧光共振能量转移(FRET)是指激发态的供体分子, 通过偶极-偶极相互作用以非辐射跃迁的方式将能量传递给受体分子的过程, 是一种长程能量转移^[14,15]. 其发生过程遵循 Förster 能量转移原理, 有效 FRET 过程的发生由两个关键因素决定: 给体的发射光谱与受体的吸收光谱存在光谱重叠; 给受体分子之间的距离要在 Förster 有效半径之内(通常为 1~10 nm)^[16]. 给受体之间的关系可以表示为^[16]:

$$k_{tr(r)} \propto \frac{1}{r^6} \cdot \kappa^2 \cdot J(\lambda) \quad (1)$$

$$J(\lambda) = \int_0^\infty F_D(\lambda) \epsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda$$

式中 $k_{tr(r)}$ 表示能量转移速率, r 表示给受体之间的距离, κ 表示方位因子, $J(\lambda)$ 表示给受体的光谱重叠积分, F_D 表示给体的荧光强度, ϵ_A 表示受体的摩尔吸光系数. 因此, 给受体之间的距离越近, 光谱重叠积分越大, 就越有利于 FRET 的发生. CPs 具有大的 π -共轭骨架以及离域电子结构, 激发态能量能够沿着整个聚合物主链移动, 因此, 整个聚合物主链的能量能够通过 FRET 有效地传递给受体分子, 从而产生荧光信号的放大. 通过疏水、静电或生物特异性相互作用改变给-受体分子之间的距离, 即可调控 FRET 效率, 从而实现目标分子的检测.

3 基于 CPs-FRET 的多色荧光体系的构建及应用

根据多色荧光体系的组成将基于 CPs-FRET 的多色荧光体系分为 3 类: 基于给-受体型 CPs 的多色荧光体系、基于 CPs 与染料的多色荧光体系以及基于多种 CPs 的多色荧光体系.

3.1 基于给-受体型 CPs 的多色荧光体系

同时含有给-受体单元的 CPs, 如同时含苄和苯并噻二唑(BT)或二噻吩基苯并噻二唑(TBT)的 CPs (图 1), 常用于构建基于 CPs-FRET 的多色荧光体系^[17]. 由于苄的荧光量子产率比较高, 它通常被作为给体单元, 缺电子的 BT 或 TBT 为受体单元. 低浓度的给-受体型 CPs 在水溶液中形成伸展的链状结构或松散的聚集体, 不能发生有效的 FRET, 此时给体的荧光占主导. 当向其中加入带相反电荷的分析物时,

图 1 给-受体型聚合物的结构式

它们通过静电及疏水相互作用形成比较紧密的复合物, 从而发生从苄单元到 BT 或 TBT 单元的 FRET, 聚合物溶液的荧光颜色发生改变. 其荧光颜色与被分析物的含量之间存在一定的比例关系, 因此, 这类 CPs 可以用于被分析物的检测.

2004 年, Bazan 课题组通过 Suzuki 偶联反应合成了含 5% BT 单元的给-受体型 CPs (P1), 并利用它与 Cy5 标记的肽核酸(PNA-Cy5: 5'-Cy5-CAGTCCAGT-GATACG-3')构建了 DNA 的多色检测体系^[18]. 如图 2 所示, 当体系中无 DNA 存在时, 中性的 PNA-Cy5 不能与 P1 结合, 用 380 nm 的激发光激发, 体系发出蓝色荧光. 当向体系中加入非互补 DNA (DNAnc)时, DNAnc 与 P1 通过静电相互作用结合导致 P1 聚集, 发生链间 FRET, 用 380 nm 的激发光激发时, 体系发射出绿色荧光. 当向体系中加入互补 DNA (DNAC)时, DNAC 与 PNA-Cy5 由于碱基配对形成 DNAC/PNA-Cy5 复合物, 该复合物与 P1 通过静电相互作用结合形成 P1/DNAC/PNA-Cy5 复合物, 从而发生 P1 到 Cy5 的 FRET, 此时用 380 nm 的激发光激发, 体系发射出红色荧光. 在该工作的启发下, 给-受体型 CPs 在多色 DNA 检测体系中的应用得到研究工作者的关注^[19,20].

除了 DNA 的多色可视化检测外, 给-受体型的 CPs 还被用于蛋白质的多色可视化检测. 本课题组^[21]将同时含给-受体单元的水溶性 CPs 与酶底物形成的静电复合物作为荧光探针, 实现了碱性磷酸酶和肽酶的多色荧光检测. 以正电荷 CPs 与负电荷底物为例, 利用该体系进行酶检测的机理如图 3 所示, 水溶性 CPs (P1、P2)与带相反电荷的底物通过静电相互作用形成复合物, 复合物的形成导致聚合物聚集, 孤立的聚合物主链彼此靠近, 激发给体苄单元时发生从苄单元到 BT 单元的高效 FRET, 聚合物发射出绿色荧光. 加入相应的酶后, 底物被酶切为碎片, 碎片与

图2 (A) DNA的多色检测原理示意图; (B) 水溶液中归一化的荧光发射光谱。(a) P1/PNA-Cy5; (b) P1/DNAnc+PNA-Cy5; (c) P1/DNAnc/PNA-Cy5. $[PNA-Cy5]=2.0 \times 10^{-8}$ mol/L; $[P1]=1.6 \times 10^{-7}$ mol/L (以重复单元计算); $\lambda_{ex}=380$ nm^[18] (网络版彩图)

图3 酶分析原理示意图^[21] (网络版彩图)

CPs (P1 或 P2)的静电相互作用较弱,从而使聚集的主链重新分散,从苋单元到 BT 单元的 FRET 效率降低,聚合物发射出的荧光逐渐变为蓝色. 通过观察聚合物的荧光颜色或强度的变化,即可实现酶活性分析. 在该工作中,本课题组分别以 ATP 和 Arg6 为底物,成功实现了碱性磷酸酶和肽酶以及相应抑制剂的检测. 随后,我们利用该体系对具有不同等电点的蛋白质进行了定性分析并成功调节了正电性 ChT 酶的活性^[22]. 我们还以透明质酸为底物检测了透明质酸酶的活性^[23]. 此后,这类聚集诱导的、基于给-受体型 CPs 的 FRET 体系在蛋白质的多色可视化检测领域得到了广泛的应用^[24-29]. 值得注意的是,由于 CPs 与酶底物以静电相互作用结合,这类体系的应用会受到酶底物电性的限制. 如何设计合成新型的 CPs,使其能够特异性检测不同电性的酶将成为未来发展的重点方向.

此外, Liu 课题组^[30]利用聚集诱导的聚合物分子内 FRET 制备得到不同荧光颜色编码的纳米粒子,并成功将其用于多色细胞成像. 首先,他们以苋单元为给体,以 BT 单元为受体,合成了一种同时含给-受体单元的阴离子共轭聚合物 P3. 如图 4(a)所示,该聚合物能够通过静电相互作用与阳离子型多肽(RGD-

图4 (a) P3/RGD-Peptide 纳米粒子的形成过程示意图; (b) 向 8 μ mol/L P3 的 PBS 溶液(15 mmol/L, pH 7.4)中加入 RGD-Peptide (0~1.0 μ mol/L)后所形成的纳米粒子溶液在 365 nm 紫外光照射下的荧光图像; (c) 用 P3/RGD-Peptide (8:0.9, $[P3]=1$ μ mol/L)纳米粒子和细胞核染料 DAPI 同时染色后 HT29 细胞的荧光图像^[30] (网络版彩图)

Peptide)自组装,形成具有荧光特性的 P3/RGD-Peptide 纳米粒子. 纳米粒子的形成使聚合物发生聚集诱导的分子内 FRET,通过调节 P3 与 RGD-Peptide 的比例,在单波长激发下即可得到不同荧光颜色编码的纳米粒子溶液(图 4(b)). 利用该纳米粒子能够成功实现表面过表达整合蛋白受体的肿瘤细胞(HT29)的靶向成像(图 4(c)).

3.2 CPs 与染料的多色荧光体系

水溶性阳离子型 CPs 能够与带负电荷的 DNA 通过静电及疏水相互作用结合成稳定的静电复合物,复合物的形成使得其中的 CPs 与标记在 DNA 上的染料分子发生 FRET,从而将染料分子的荧光强度提高约一个数量级,因此,这类阳离子型 CPs 已经被广泛地用于高灵敏的 DNA 检测^[31-34]. 在上述现象的启发下,科研工作者设计了多种荧光染料标记的 DNA 分子,通过阳离子型 CPs 与多种荧光染料之间的多步 FRET 可以实现多色荧光编码,从而构建出基于 CPs 与染料的多色荧光体系^[11,35]. 根据检测的需要,在 DNA 分子上标记荧光染料的方法有很多种,其中最主要的两种方法是扩增引入荧光染料标记的核苷酸及引入双链 DNA 特异性结合染料.

溴化乙锭(EB)是一种嵌入型荧光染料,它不能与单链 DNA (ssDNA)结合,但可以嵌插到双链 DNA (dsDNA)中,并发生荧光信号的增强. 2004 年 Bazan 课题组^[36]发现,阳离子型 CPs (聚{(1,4)-亚苯基-2,7-

[9,9-二(6-*N,N,N*-三甲基氯化铵)-己基]-二碘化芘})与嵌入 dsDNA 中的 EB 间的 FRET 效率很低,但是当用荧光素(FI)标记 dsDNA 后,CPs 与嵌入其中的 EB 间发生 CPs→FI 和 FI→EB 两步 FRET,FI 的传导作用导致二者之间总的 FRET 效率得到大大提高.随后,本课题组和 Bazan 课题组^[37]利用该原理成功实现了 DNA 由 G-四联体结构到双螺旋结构的转变过程以及碱基错配数目的检测.如图 5(a)所示,在由 P4、EB 和 FI 标记的 G-四联体(G-FI)组成的混合体系中,P4 与 G-FI 由于静电相互作用而彼此靠近,此时 EB 不能插入 G-FI 中,激发 P4 时,只能发生从 P4 到 FI 的 FRET.向体系中加入互补的 ssDNA(ssDNA_C)后,ssDNA_C 与 G-FI 形成双螺旋结构,EB 插入其凹槽中,此时激发 P4,发生两步 FRET: P4→FI (FRET-1)和 FI→EB (FRET-2).由于偶极取向的原因,直接从 P4 到 EB 的 FRET 非常弱,可以忽略不计.因此,通过观察激发 P4 时是否有 EB 的荧光发射就能够检测 G-四联体结构到双螺旋结构的转变(图 5(b)).此外,FRET 效率随所加入的待测 DNA 中碱基错配数目的变化而变化(图 5(c)),故该体系可以用于碱基错配数目的检测.此后,该原理在生物检测体系中的应用受到越来越多的重视.本课题组^[38,39]利用阳离子型聚苄衍生物、EB 和 FI 标记的发夹 DNA 组成的混合体系实现了碱基错配数目的多色可视化检测.此外,Tang 课题组^[40]利用 P4、EB、FI 标记的互补 DNA 以及含腺苷适配体序列的核酸适配体,成功实现了腺苷脱氨酶的多色可视化检测.这种检测方法简单、快速、特异性好、

灵敏度高(检出限为 0.5 U/L),在酶及其抑制剂的检测方面具有潜在的应用价值.

由于嵌入型染料与 dsDNA 的结合没有选择性,所以上述体系只能用来检测碱基错配的数目,不能对特定位置的基因突变进行检测.为了实现特定位置的基因突变的多色可视化检测,本课题组^[11]以 5'-TGCCTGTCCTGGGAGAGAC-3'为引物,通过在单碱基延伸(SBE)反应中同时加入 dUTP-FI 和 dCTP-Cy3,成功实现了 p53 基因外显子 8 中的单碱基突变(SNP)位点的 3 种基因型(纯合 A/A、杂合 G/A 和纯合 G/G)的多色可视化检测.这种 SNP 分型方法的检出限为 5.3 fmol,具有较高的灵敏度.为了进一步实现临床样本的实时测定,在对上述检测方法进行优化后,本课题组^[35]以 PFP、dUTP-FI 和 dATP-TR 为基础,建立了基于 CPs-FRET 的多色荧光编码系统,成功实现了 PIK3CA 基因突变的多重可视化检测.在该体系中,P4 为 FI 和 TR 的能量给体,FI 为 P4 的能量受体以及 TR 的能量给体,TR 为 P4 和 FI 的能量受体.PIK3CA 为待测目的基因,它含有 4 个热点突变位点:位于外显子 9 的 E542K (G1624A)和 E545K (G1633A);位于外显子 20 的 H1047R (A3140G)和 H1047L (A3140T).图 6(a)中以 E545K 和 H1047R 为例展示了该体系的检测原理.首先,对 PIK3CA 中的外显子 9 和 20 进行 PCR 扩增.然后,同时用两条分别针对 E545K 和 H1047R 突变体的 SBE 引物、Taq DNA 聚合酶、dUTP-FI 和 dATP-TR 进行 SBE 延伸反应,再向其中加入带正电荷的 P4.对 E545K 突变,仅 dATP-TR 能够延伸至 E545K 引物上,发生 P4→TR 的 FRET;对 H1047R 突变,仅 dUTP-FI 能够延伸至 H1047R 引物上,发生 P4→FI 的 FRET;对二者的同时突变,dUTP-FI 和 dATP-TR 能够分别延伸至 H1047R 和 E545K 引物上,发生多步 FRET (P4→FI、P4→TR、FI→TR);对野生型,不能发生 SBE 延伸反应,无 FRET 发生.因此,在 365 nm 的紫外光照射下,反应溶液的颜色会发生变化,4 种情况下分别发射出粉红色(E545K 突变)、橙红色(E545K 和 H1047R 同时突变)、黄绿色(H1047R 突变)和蓝紫色(野生型)的荧光(图 6(b)),通过荧光颜色的变化即可区分不同的突变情况.随后,我们按不同的比例将野生型 DNA 与突变型 DNA 混合,构建出含不同突变比例的样品,并用上述检测体系测定.通过分析所得图像的 RGB 值实现了 DNA 突变的定量检测,此方法的灵敏度非

图 5 (a) G-四联体结构转变为双螺旋结构的检测原理示意图; (b) P4、G-FI 和 EB 的混合体系在有无 ssDNA_C 存在时的荧光光谱; (c) FRET 比率随互补链中单碱基错配数目的变化(平行测 4 次). [P4]= 1.25×10^{-6} mol/L (以重复单元计算); [G-FI]=[ssDNA_X]= 5.0×10^{-8} mol/L (X=0、1、3 或 6); [EB]= 1.5×10^{-6} mol/L; λ_{ex} =380 nm^[37](网络版彩图)

图 6 (a) PIK3CA 基因突变的多色可视化检测原理图; (b) 365 nm 紫外光照射下的多色可视化检测图像^[35] (网络版彩图)

常高, 能够检测到 2% 的 DNA 突变. 本课题组利用该检测体系一次性测定了 30 个结肠癌样本的 PIK3CA 基因突变情况, 成功实现了基因突变的高通量、多重可视化检测. 此外, 本课题组^[41]还利用类似的体系成功实现了 KRAS 和 BRAF 基因突变的多重可视化检测.

为了满足更复杂的实际样品的检测需求, 本课题组^[42]将双脱氧测序反应和 P4 与染料间的多步 FRET 相结合, 建立了 FRET 指纹图谱(FRET-based finger-print spectrum, FFS), 用于基因突变的多重定性检测. 首先, 我们在引物、DNA 聚合酶、dNTPs 和 dye-ddNTPs 的存在下对目标 DNA 进行双脱氧测序反应. 在该反应过程中, 目标 DNA 上一个碱基发生改变, 延伸产物上标记的 4 种染料(FI、Cy3、TR 和 Cy5)的比例就会发生变化. 对突变 1, 野生型中的 T 碱基突变成了 A 碱基, FI-ddUTP 会取代 TR-ddATP 标记到延伸产物中, 使得总延伸产物中标记 FI 的链增多, 标记 TR 的链减少. 同理, 对突变 2, 野生型中的 C 碱基突变成了 G 碱基, 总延伸产物中标记 Cy3 的链增多, 标记 Cy5 的链减少. 向延伸产物中加入 P4 后, 带正电的 P4 与带负电的 DNA 由于强静电相互作用而彼此拉近. 在 380 nm 的激发光激发下, P4 与 4 种染料间

发生多步 FRET. 收集多步 FRET 的荧光光谱, 计算 FRET 比值, 分析得到以 Δ FRET 比值为纵坐标的 FFS. 相比于传统的双脱氧测序反应, 该体系中 dye-ddNTPs 比 dNTPs 的浓度高很多. 因此, 在靠近延伸引物 3' 端, 只要有一个碱基突变, 4 种染料的标记比例就会发生明显的改变, 从而导致相应的 FFS 发生显著变化. 据此, 本课题组建立了基因突变的多重检测新体系, 利用该检测体系建立了针对不同突变情况的标准 FFS, 分别针对多个非相邻 DNA 突变(以 PIK3CA 的 4 个热点突变为例)、相邻 DNA 突变(以 KRAS 的外显子 2 上的 12 个突变为例)、缺失突变和插入突变. 研究发现, 样本突变比例的增加, 对 FFS 的形状没有影响, 只会使 FFS 中的 Δ FRET 比值增大. 该方法的检测灵敏度非常高, 能够检测到 5% 的 E542K、E545K、H1047R 或 H1047L 突变. 因此, 该体系可以用于定性及定量检测多个 DNA 突变. 我们利用该体系成功检测了 30 个乳腺癌样本中 PIK3CA 的突变情况.

3.3 基于多种 CPs 的多色荧光体系

为了发展更多简单、快捷、易调控的基于 CPs 的多色荧光体系, 科研工作者利用带负电荷的物种(DNA、蛋白质或细菌)与带正电荷的 CPs 之间的静电及疏水相互作用实现了多种具有不同荧光发射的阳离子型 CPs 之间的多步 FRET^[12,43,44], 成功构建了基于 CPs-FRET 的多色荧光体系.

染色体是由带负电荷的 DNA 和带正电荷的组蛋白组成的, 因此它可以被看作一种天然的界面静电复合(IPC)纤维材料. 为了获得像染色体一样具有良好的生物相容性的多色 IPC 纤维材料, 本课题组^[43]利用 DNA 介导多种不同荧光颜色的阳离子型 CPs 和组蛋白自组装形成具有不同荧光发射的 IPC 纤维, 并成功将其用于细菌的封装. 首先, 我们合成了分别发射蓝色、绿色、橙红色和红色荧光的阳离子型 CPs (图 7(a)), 它们能够通过界面静电复合的方式与鲑鱼精 DNA 和组蛋白自组装形成具有荧光特性的 IPC 纤维(图 7(b)). 然后, 我们将不同比例的红、绿、蓝 3 种荧光颜色的 CPs 与组蛋白混合到一起, 再与 DNA 共组制备 IPC 纤维, 在 365 nm 紫外光照射下得到了不同荧光颜色编码的界面静电复合纤维. 在 380 nm 的激发光激发下, 这些纤维的固体荧光光谱中出现了红光发射聚合物 P8 的发射峰(600 nm 左右), 从而证

图 7 (a) P5~P8 的结构式; (b) 由不同浓度的 P5~P8 (依次用 B、G、O 和 R 表示) 制备的 IPC 纤维在 365 nm 紫外光照射下的荧光图像; (c) 封装有 GFP 基因编码的大肠杆菌(BL21 菌株)的 IPC 纤维的激光扫描共聚焦显微镜图像(从左到右: GFP 荧光场、明场、荧光场和明场的叠加), 绿色是 GFP 的伪色^[43] (网络版彩图)

明红、绿、蓝 3 种 CPs 间能够发生有效的 FRET. 调节红、绿、蓝 3 种 CPs 的比例即可调控它们之间的 FRET 效率, 进而调控纤维的荧光颜色. 我们进一步用等温量热滴定法证明纤维形成的作用力主要有静电相互作用、疏水相互作用以及反离子和结合水的释放. 这些 IPC 纤维可以用于封装 GFP 基因编码的大肠杆菌(BL21 菌株), 当将这些纤维放在不含 IPTG 的培养基中培养时, 封装在纤维中的细菌不能表达出绿色荧光蛋白; 当在含有 IPTG 的培养基中培养时, 封装在纤维中的细菌能够表达出绿色荧光蛋白(图 7(c)). 因此, 通过改变外界环境即可调控细菌内部 GFP 的表达. 此外, 这些 IPC 纤维具有生物相容性好、通透性好以及稳定性好的优点, 在生物传感及组织工程领域表现出潜在的应用价值.

多色的表达方式对人们研究细胞及其内部细胞器的迁移、细胞内生化过程的追踪以及分子间的相互作用过程有着重要的作用. CPs 由于具有优良的光学性能而被广泛地用于细胞的生物学过程分析, 但是利用它们进行多色细胞成像的研究目前还比较少. 本课题组^[12]利用细菌介导多种不同荧光颜色的 CPs 自组装形成多色荧光编码的微粒, 并成功将其用于细胞成像及流式细胞分析. 首先, 我们合成了分别发射蓝色、绿色、黄色和红色荧光的 CPs (图 8(a)), 它

图 8 (a) P9~P12 的结构; (b) *E. coli* 介导的蓝色、绿色和红色荧光的 CPs (依次用 B、G、R 表示) 自组装形成的多色荧光编码的微粒在 365 nm 紫外光照射下的荧光图像; (c) A549 细胞用多色荧光编码的微粒染色后的荧光图像^[12] (网络版彩图)

们在水溶液中可以形成平均粒径为 50~100 nm 的 CPNs. 为了得到更多的荧光颜色, 以非致病侵入型大肠杆菌(*E. coli*)为载体, 通过疏水及静电相互作用, 将红、绿、蓝 3 种颜色的 CPNs 自组装. 在细菌的介导下, 这 3 种颜色的 CPs 之间能够发生多步 FRET, 通过调节它们的比例即可得到多色荧光编码的微粒(图 8(b)). 这些多色微粒的吸收光谱范围为 350~600 nm, 在 371 nm 的激发光激发下, 最大发射波长范围为 470~600 nm, 能够与大多数荧光分析仪器的光源相匹配(400、488 和 532 nm). 此外, 如图 8(c)所示, 这些多色微粒还可以通过内吞作用进入 A549 细胞的细胞质, 并在细胞核周围富集, 不同荧光颜色的微粒标记的细胞可以通过流式细胞分析仪区分开. 因此, 这些多色荧光编码的微粒不仅可以用于多色细胞成像, 还可用于细胞标记和计数, 在临床诊断中有潜在的应用价值.

此外, 科研工作者利用再沉淀的方法将多种具有不同荧光发射的非水溶性 CPs 与两亲性基质制备成功能化的 CPNs, 从而实现了 CPs 之间的 FRET, 成功建立了基于 CPs-FRET 的多色荧光体系^[13]. 与游离的 CPs 以及通过简单的静电和疏水相互作用构建的多色荧光体系相比, CPNs 具有许多独特的优点, 如大的双光子吸收截面、尺度可控、表面易修饰以及能被细胞内吞. 而且, CPNs 没有尺寸依赖效应和间歇性发光现象. 因此, 这种构建基于多种 CPs 的多色荧光体系的方法具有广阔的应用前景. 然而, CPNs 不是特别稳定, 容易聚集产生沉淀, 不能够长期保存, CPNs 的广泛应用将依赖于这一问题的解决.

本课题组^[13]将蓝、绿、黄、红 4 种颜色的 CPs 按照一定的比例混合后与 PMSA 自组装, 形成羧基修饰的 CPNs, 进一步用抗体修饰后, 成功实现了肿瘤细胞的靶向成像. 如图 9(a)所示, 我们通过 Suzuki 交叉偶联聚合反应合成了 4 种分别发射蓝色、绿色、黄色和红色荧光的 CPs (P13~P16), 它们可与 PMSA 通过疏水相互作用共沉淀, 得到羧基修饰的 CPNs. 羧基修饰的 CPNs 具有光稳定性好及细胞毒性低的优点, 并且表面的羧基能够与抗体上的氨基在 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)的催化下发生酸胺缩合反应, 得到抗体修饰的 CPNs. 我们利用 anti-EpCAM 修饰的 CPNs 实现了 MCF-7 细胞的靶向成像, 并且用二抗(IgG)修饰的 CPNs 进一步增强了成像亮度. 此外, 通过在 CPNs 上分别修饰不同的抗

体(anti-EpCAM 和 anti-ErbB2), 成功实现了同属乳腺癌细胞系的 SK-BR-3 细胞和 MCF-7 细胞的区分. 值得注意的是, 将一定比例的 P13~P16 混合后与 PMSA 共沉淀能够得到尺寸在 30 nm 左右的 CPNs (P13~16/PMSA). 由于 P13~P16 的吸收光谱和发射光谱之间存在明显的重叠, 它们在所得 CPNs 中能够发生 FRET, 用短波段的激发光激发即可得到覆盖整个可见光谱区的荧光发射. 依据这一优势, 我们用 anti-EpCAM 修饰 P13~P16/PMSA 得到 P13~P16/PMSA/anti-EpCAM 纳米粒子, 然后将其用于 MCF-7 细胞靶向成像. 实验结果表明, P13~P16/PMSA/anti-EpCAM 纳米粒子可以被 405、488 和 559 nm 3 种激发光激发, 从而得到多色细胞成像图像(图 9(b)). 因此, 这种抗体修饰的多色 CPNs 有望用于多通道的细胞成像和检测.

4 结论

本文详细介绍了 CPs 的 FRET 机制、基于 CPs-FRET 的多色荧光体系的构建方法及其在生物医学领域中的应用. 这些多色荧光体系具有荧光强度高、光稳定性好以及细胞毒性低的优点. 利用这类体系在单波长的激发光激发下即可实现目标分子的多色荧光检测及多色荧光成像. 虽然研究工作者已经利用这些多色荧光体系在相关领域取得了一系列振

图 9 (a) 聚合物纳米粒子的制备及修饰过程示意图(以 P13~P16/PSMA 为例); (b) P13~P16/PSMA/anti-EpCAM 纳米粒子的多色细胞成像图像^[13] (网络版彩图)

奋人心的成果,但是仍然存在一些因素限制了这类体系在实际工作中的应用:(1)在实时、原位检测体系中,聚合物的自聚集及其与体系中非目标底物之间的疏水或静电相互作用;(2)虽然能够利用这类体系实现特定细胞的靶向成像,但是它们在生物体内的靶向成像能力还未确定;(3)该体系对生物体的潜在毒性.尽管如此,我们还是认为有机会通过设计开

发新型的基于CPs-FRET的多色荧光体系来解决上述问题.同时,我们认为,该体系的进一步发展将重点考虑疾病相关标志物的多色可视化检测、肿瘤细胞的靶向成像及治疗两个方面.希望这篇综述能为读者提供近期有关这类多色荧光体系的构建及生物应用的前沿性工作,进而为拓展这类体系在生物医学领域中的进一步应用做出贡献.

致谢 本文得到国家自然科学基金(21003140, 21273254)和国家重点基础研究发展计划(2011CB935800, 2011CB808400)资助,特此一并致谢.

参考文献

- 1 Liu B, Bazan GC. Homogeneous fluorescence-based DNA detection with water-soluble conjugated polymers. *Chem Mat*, 2004, 16: 4467–4476
- 2 He F, Wang S. Water-soluble conjugated polymers for protein detections. *Prog Chem*, 2009, 21: 2372–2378
- 3 Duan XR, Liu LB, Feng FD, Wang S. Cationic conjugated polymers for optical detection of DNA methylation, lesions, and single nucleotide polymorphisms. *Acc Chem Res*, 2010, 43: 260–270
- 4 Feng XL, Liu LB, Wang S, Zhu DB. Water-soluble fluorescent conjugated polymers and their interactions with biomacromolecules for sensitive biosensors. *Chem Soc Rev*, 2010, 39: 2411–2419
- 5 Zhu CL, Liu LB, Yang Q, Lv FT, Wang S. Water-soluble conjugated polymers for imaging, diagnosis, and therapy. *Chem Rev*, 2012, 112: 4687–4735
- 6 Feng GX, Ding D, Liu B. Fluorescence bioimaging with conjugated polyelectrolytes. *Nanoscale*, 2012, 4: 6150–6165
- 7 Shen XQ, Li L, Chan ACM, Gao NY, Yao SQ, Xu QH. Water-soluble conjugated polymers for simultaneous two-photon cell imaging and two-photon photodynamic therapy. *Adv Opt Mater*, 2013, 1: 92–99
- 8 Kim IB, Shin H, Garcia AJ, Bunz UHF. Use of a folate-PPE conjugate to image cancer cells *in vitro*. *Bioconjugate Chem*, 2007, 18: 815–820
- 9 Yu DY, Zhang Y, Liu B. Interpolyelectrolyte complexes of anionic water-soluble conjugated polymers and proteins as platforms for multicolor protein sensing and quantification. *Macromolecules*, 2008, 41: 4003–4011
- 10 Pu KY, Zhan RY, Liu B. Conjugated polyelectrolyte blend as perturbable energy donor-acceptor assembly with multicolor fluorescence response to proteins. *Chem Commun*, 2010, 46: 1470–1472
- 11 Duan XR, Wang S, Li ZP. Conjugated polyelectrolyte-DNA complexes for multi-color and one-tube SNP genotyping assays. *Chem Commun*, 2008: 1302–1304
- 12 Feng XL, Yang GM, Liu LB, Lv FT, Yang Q, Wang S, Zhu DB. A convenient preparation of multi-spectral microparticles by bacteria-mediated assemblies of conjugated polymer nanoparticles for cell imaging and barcoding. *Adv Mater*, 2012, 24: 637–641
- 13 Feng LH, Liu LB, Lv FT, Bazan GC, Wang S. Preparation and biofunctionalization of multicolor conjugated polymer nanoparticles for imaging and detection of tumor cells. *Adv Mater*, 2014, 26: 3926–3930
- 14 Förster T. Intermolecular energy migration and fluorescence. *Ann Phys*, 1948, 2: 55–75
- 15 Förster T. Transfer mechanisms of electronic excitation. *Discuss Faraday Soc*, 1959: 7–17
- 16 Lakowicz JR. *In Principles of Fluorescence Spectroscopy*. New York: Kluwer Academic, 1999
- 17 Zhan RY, Liu B. Benzothiadiazole-containing conjugated polyelectrolytes for biological sensing and imaging. *Macromol Chem Phys*, 2015, 216: 131–144
- 18 Liu B, Bazan GC. Interpolyelectrolyte complexes of conjugated copolymers and DNA: platforms for multicolor biosensors. *J Am Chem Soc*, 2004, 126: 1942–1943
- 19 Lin SM, Liu SP, Zou HX, Zeng WN, Wang LY, Beuerman R, Cao DR. Synthesis of diketopyrrolopyrrole-containing conjugated polyelectrolytes for naked-eye detection of DNA. *J Polym Sci, Part A: Polym Chem*, 2011, 49: 3882–3889
- 20 Wang YF, Zhan RY, Li TH, Pu KY, Wang YY, Tan YKC, Liu B. Fluorescence and visual detection of single nucleotide polymorphism using cationic conjugated polyelectrolyte. *Langmuir*, 2012, 28: 889–895

- 21 An LL, Tang YL, Feng FD, He F, Wang S. Water-soluble conjugated polymers for continuous and sensitive fluorescence assays for phosphatase and peptidase. *J Mater Chem*, 2007, 17: 4147–4152
- 22 An LL, Wang S, Zhu DB. Conjugated polyelectrolytes for protein assay and manipulation of catalytic activity of enzyme. *Chem Asian J*, 2008, 3: 1601–1606
- 23 An LL, Liu LB, Wang S. Cationic conjugated polymers for homogeneous and sensitive fluorescence detection of hyaluronidase. *Sci China Ser B-Chem*, 2009, 52: 827–832
- 24 Pu KY, Liu B. Fluorescence turn-on responses of anionic and cationic conjugated polymers toward proteins: effect of electrostatic and hydrophobic interactions. *J Phys Chem B*, 2010, 114: 3077–3084
- 25 Lee JH, Kim DG, Kwon NY, Jang GS, Son JH, Lee M, Cho HJ, Kweon HS, Lee TS. Protein-induced aggregation of fluorescent conjugated polyelectrolytes with sulfonate groups: synthesis and its sensing application. *J Polym Sci, Part A: Polym Chem*, 2011, 49: 138–146
- 26 Seo S, Kim J, Jang G, Kim D, Lee TS. Aggregation-deaggregation-triggered, tunable fluorescence of an assay ensemble composed of anionic conjugated polymer and polypeptides by enzymatic catalysis of trypsin. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2014, 6: 918–924
- 27 Kim D, Lee TS. The detection of thrombin using a mixture of a fluorescent conjugated polyelectrolyte and fibrinogen and implementation of a logic gate. *Chem Commun*, 2014, 50: 5833–5836
- 28 You J, Park T, Kim J, Heo JS, Kim HS, Kim HO, Kim E. Highly fluorescent conjugated polyelectrolyte for protein sensing and cell-compatible chemosensing applications. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2014, 6: 3305–3311
- 29 Sun PF, Lu XM, Fan QL, Zhang ZY, Song WL, Li B, Huang L, Peng JW, Huang W. Water-soluble iridium(III)-containing conjugated polyelectrolytes with weakened energy transfer properties for multicolor protein sensing applications. *Macromolecules*, 2011, 44: 8763–8770
- 30 Pu KY, Li K, Liu B. Multicolor conjugate polyelectrolyte/peptide complexes as self-assembled nanoparticles for receptor-targeted cellular imaging. *Chem Mater*, 2010, 22: 6736–6741
- 31 Baker ES, Hong JW, Gaylord BS, Bazan GC, Bowers MT. PNA/dsDNA complexes: site specific binding and dsDNA biosensor applications. *J Am Chem Soc*, 2006, 128: 8484–8492
- 32 Ho HA, Bera-Aberem M, Leclerc M. Optical sensors based on hybrid DNA/conjugated polymer complexes. *Chem Eur J*, 2005, 11: 1718–1724
- 33 Gaylord BS, Massie MR, Feinstein SC, Bazan GC. SNP detection using peptide nucleic acid probes and conjugated polymers: applications in neurodegenerative disease identification. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 34–39
- 34 Duan XR, Yue W, Liu LB, Li ZP, Li YL, He FC, Zhu DB, Zhou GQ, Wang S. Single-nucleotide polymorphism (SNP) genotyping using cationic conjugated polymers in homogeneous solution. *Nat Protoc*, 2009, 4: 984–991
- 35 Song JZ, Yang Q, Lv FT, Liu LB, Wang S. Visual detection of DNA mutation using multicolor fluorescent coding. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2012, 4: 2885–2890
- 36 Wang S, Gaylord BS, Bazan GC. Fluorescein provides a resonance gate for FRET from conjugated polymers to DNA intercalated dyes. *J Am Chem Soc*, 2004, 126: 5446–5451
- 37 He F, Tang YL, Yu MH, Feng FD, An LL, Sun H, Wang S, Li YL, Zhu DB, Bazan GC. Quadruplex-to-duplex transition of G-rich oligonucleotides probed by cationic water-soluble conjugated polyelectrolytes. *J Am Chem Soc*, 2006, 128: 6764–6765
- 38 Feng XL, Duan XR, Liu LB, An LL, Feng FD, Wang S. Cationic conjugated polyelectrolyte/molecular beacon complex for sensitive, sequence-specific, real-time DNA detection. *Langmuir*, 2008, 24: 12138–12141
- 39 Feng XL, Xu QL, Liu LB, Wang S. A new light-harvesting conjugated polyelectrolyte microgel for DNA and enzyme detections. *Langmuir*, 2009, 25: 13737–13741
- 40 Wang C, Tang YL, Liu Y, Guo Y. Water-soluble conjugated polymer as a platform for adenosine deaminase sensing based on fluorescence resonance energy transfer technique. *Anal Chem*, 2014, 86: 6433–6438
- 41 Xing BL, Song JZ, Ge SM, Tang ZH, Liu ML, Yang Q, Lu FT, Liu LB, Wang S. Multiplex detection of KRAS and BRAF mutations using cationic conjugated polymers. *Chin Sci Bull*, 2013, 58: 873–878
- 42 Song JZ, Zhang JY, Lv FT, Cheng YQ, Wang B, Feng LH, Liu LB, Wang S. Multiplex detection of DNA mutations by the fluorescence fingerprint spectrum technique. *Angew Chem Int Ed*, 2013, 52: 13020–13023
- 43 Wang FY, Liu Z, Wang B, Feng LH, Liu LB, Lv FT, Wang YL, Wang S. Multi-colored fibers by self-assembly of DNA, histone proteins, and cationic conjugated polymers. *Angew Chem Int Ed*, 2014, 53: 424–428
- 44 Pu KY, Shi JB, Wang LH, Cai LP, Wang GA, Liu B. Mannose-substituted conjugated polyelectrolyte and oligomer as an intelligent energy transfer pair for label-free visual detection of concanavalin A. *Macromolecules*, 2010, 43: 9690–9697

Preparation of water-soluble conjugated polymers based multi-color fluorescent systems for biomedical applications

Fengyan Wang^{1,2}, Xiaoyu Wang², Shengliang Li², Libing Liu^{2*}, Fengting Lv², Shu Wang^{2*}

1 School of Materials Science and Engineering, Chang'an University, Xi'an 710064, China

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

*Corresponding authors (email: liulibing@iccas.ac.cn; wangshu@iccas.ac.cn)

Abstract: Conjugated polymers (CPs) have gained increasing attention as an optical platform for sensitive detection of biomacromolecules and fluorescent imaging in cellular and animal level due to its excellent light-harvesting and light-amplifying properties. Over the past decades, in order to meet the needs of multi-color fluorescent detection and imaging, researchers have designed and developed a series of multicolor fluorescent systems based on the fluorescence resonance energy transfer properties of conjugated polymers (CPs-FRET). The advantages of these systems include high brightness, excellent photostability, and low cytotoxicity. Multicolor fluorescence encoded detection of target molecules and fluorescence imaging can be achieved using such systems under a single excitation wavelength. In this tutorial review, we describe the FRET mechanism of CPs and the preparation of CPs-FRET based multicolor fluorescent systems, provide a brief review of the recent research progress of such systems in biochemical detection and cell imaging, and discuss the current problems and future direction of such systems.

Keywords: water soluble conjugated polymers, fluorescence resonance energy transfer, multi-color fluorescent systems, biochemical detection, cell imaging