

应用光亲和分子进行 PEG 的光照修饰及蛋白质的光照偶联*

尉继征^{1,2} 杨立新¹ 胡秀丽¹ 黄宇彬¹ 陈学思¹ 景遐斌^{1**}

(¹ 中国科学院长春应用化学研究所高分子物理与化学国家重点实验室 长春 130022)

(² 中国科学院研究生院 北京 100049)

摘 要 合成了一种光活性标记分子-对叠氮苯甲酸,将其偶联到具有双羟基的碳酸酯与乳酸的共聚物 P(LA-co-DHP)上,获得了具有光反应活性的可生物降解共聚物 P(LA-co-DAP),在光照条件下,可以将蛋白质方便快捷地共价偶联到 P(LA-co-DHP)聚合物纤维上.在溶液中进行 PEG 与对叠氮苯甲酸的光照反应,通过核磁共振光谱检测,证明了对叠氮苯甲酸可以直接修饰到 PEG 侧链上,形成苯甲酸侧基 PhCOOH.这是其它化学修饰方法很难做到的.实验还证明,对叠氮苯甲酸对 PEG 的光亲和修饰不但能在溶液中进行,而且能在 PEG 自组装膜的表面进行.

关键词 光亲和标记,光敏感聚合物,蛋白质固定,PEG 修饰

光亲和标记(photoaffinity labeling, PAL),也称为光敏感探针(photoactive probe).自 40 多年前由 Singh 等^[1]提出以来,已取得了令人瞩目的发展^[2-5].它运用化学合成的光敏小分子化合物作为工具探针,经特定波长的光照射,分解产生高活性的中间体,与目标分子的活性部位形成不可逆的共价结合.它具有以下几个优点:首先,光照反应是个一步反应,它简单、高效,而且不需要在目标分子上进行功能化修饰,因此,它经常被用于一些缺少功能基团的生物分子的偶联;第二,光照反应条件温和,不受 pH、温度等条件的影响;第三,反应不需借助其它化学试剂或有机溶剂,可以避免生物分子变性.因而在分子生物学、细胞生物学、有机化学等领域获得了越来越广泛的应用.常用的光亲和基团主要有苯基叠氮类(phenyl azides)^[6]、三氟甲基苯基双吡丙啉类(trifluoromethylphenyl diazirine)^[7,8]、二苯甲酮类(benzophenone)等^[9,10].这类分子在一定波长的紫外光激发下可产生氮烯或卡宾型的活性中间体,既能与亲核的基团 X—H(X = N, S, O)反应,也能与 C—H 官能团反应^[2,11].

自从提出“高分子功能化和智能化”的概念以来,由于光亲和标记的上述特点和优点,人们开始将光亲和标记的技术运用于高分子材料的功能

化和智能化,即通过高分子的光亲和标记实现高分子与功能分子、生物分子之间的共价偶联.与其它的高分子改性方法如表面接枝、等离子聚合及与功能单体共聚合相比,这种方法可能具有以下优势:(1)能适用于各类型的高分子,天然的或合成的,亲水的或疏水的;(2)可以偶联的生物分子很多,如各种抗凝剂、抗菌剂、抗生素、生长因子、多肽、酶、蛋白质等;(3)光偶联反应可以在溶液中进行,也可以在固态或固液界面进行,特别适用于高分子固体表面的修饰;(4)反应条件温和、速度快、时间短、无污染.通过光照偶联在高分子材料的表面引入各种生物功能的分子,将有助于扩大高分子材料在分子生物学、细胞生物学、药理学、临床医学等众多领域中的应用^[3-5,12-16].

作为 PAL 方法进行高分子修饰的一个实例,本文合成了一种光亲和标记分子——对叠氮苯甲酸,并用其修饰缺乏可反应基团的聚氧乙烯(PEG),在其分子链上引入侧羧基(PhCOOH),并将其连接在具有双羟基的碳酸酯与乳酸的共聚物 P(LA-co-DHP)上,获得了具有光反应活性的可生物降解共聚物——P(LA-co-DAP).在 254 nm 紫外光照射下,将蛋白质共价偶联到聚合物纤维上.

* 2011-04-02 收稿,2011-06-30 修稿;中国科学院百人计划(项目号 KGCX2-YW-802)、国家重点基础研究发展计划(973 计划,项目号 2009CB930102)和国家高技术研究发展计划(863 计划,项目号 2007AA03Z535)、国家自然科学基金青年科学基金(基金号 51003101);

** 通讯联系人,E-mail:xbjing@ciac.jl.cn

doi:10.3724/SP.J.1105.2011.11080

1 实验方法

1.1 试剂与仪器

实验所用对氨基苯甲酸购自北京市兴津化工厂,异硫氰酸荧光素(FITC)购自长春鼎国生物技术有限公司,牛血清白蛋白(BSA)购自 Sigma-Aldrich 公司(USA),二环己基碳二亚胺(DCC)和 4-二甲氨基吡啶(DMAP)购自 Acros 公司.叠氮化钠(NaN_3)、亚硝酸钠(NaNO_2)等常规试剂及溶剂均为北京化学试剂厂产品.

高压静电纺丝设备为实验室自制^[17].将 20 mL 纺丝液装入接有内径为 0.4 mm 的平头针的 30 mL 注射器中,纺丝液流速 10 mL/h,施加电压 25 kV,纺丝温度 20~22℃.

紫外光照实验用 FC-100 型紫外灯(Spectronics, USA),功率 100 W,中心波长为 254 nm,光照强度 5000 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$.

红外光谱采用 Nicolet 6700 型(Thermo, GWC, USA)傅里叶变换红外光谱仪记录.样品和 KBr 混合后研磨压片测试.分辨率为 32 cm^{-1} ,扫描次数 32 次.紫外光谱仪为岛津 UV-2104 型紫外分光光度计(日本).激光共聚焦显微镜型号为 Leica TCS SP2 CLSM (Leica Microsystems Heidelberg GmbH, 德国),由 543 nm He/Ne 激光光源激发.

核磁共振氢谱($^1\text{H-NMR}$)由 Bruker AM300 核磁共振谱仪测量,溶剂为 CDCl_3 ,以四甲基硅烷(TMS)为内标.

硫元素含量采用电感耦合等离子体发射光谱仪(Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometer, ICP-OES)进行测定,测定前样品先进行酸水解处理.

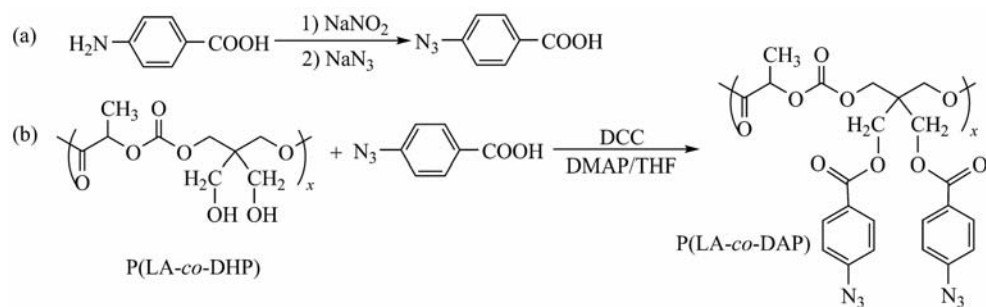
傅里叶变换-表面等离子体共振仪(FT-SPR)测量采用 SPR100 模块(Thermo, GWC, USA),使用 Nicolet 6700 型红外光谱仪(Thermo, GWC, USA)为其提供近红外光源.传感金片大小为 18 mm $\times$ 18 mm,厚度为 1 mm,金膜厚度 45 nm.

1.2 对叠氮苯甲酸(AZ)的合成

参考文献[18]方法(示意图 1 的合成路线(a)),在 500 mL 烧杯中将对氨基苯甲酸 6.8 g (0.050 mol)溶解于 100 mL 含有 10% 盐酸的水溶液中,将 3.8 g (0.055 mol) NaNO_2 溶于 50 mL 蒸馏水,在冰浴条件下通过恒压滴液漏斗逐滴加入对氨基苯甲酸的溶液中,充分搅拌反应 20 min.然后将 3.9 g (0.060 mol) NaN_3 溶于 50 mL 蒸馏水,同样通过恒压滴液漏斗逐滴加入反应液中,在避光条件下冰浴反应 1 h,室温反应 24 h.反应完成后,过滤收集生成的沉淀,用 10% 盐酸水溶液充分洗涤,再用蒸馏水洗至 pH 为中性.收集产物,冷冻干燥后,测定产物的红外光谱以确定结构.产物干燥避光保存.

1.3 光敏聚合物的合成

以本实验室前期工作^[19,20]合成的带有双羟侧基的可生物降解脂肪族聚酯 P(LA-co-DHP)作为主链,通过酯化缩合将对叠氮苯甲酸键合到聚合物侧链上.具体缩合方法(见示意图 1 的合成路线(b))为:在干燥的圆底烧瓶中加入 P(LA-co-DHP) 5 g (0.5 mmol)、对叠氮苯甲酸 0.8 g (5 mmol)和干燥的四氢呋喃 50 mL,磁力搅拌至完全溶解后,将烧瓶置于冰浴中,再加入 DCC 1.0 g (5 mmol)和 DMAP 0.6 g (5 mmol),充分搅拌,反应 24 h.将反应液倒入乙醚中沉降,过滤洗涤,收集沉淀,真空干燥后得到带有光活性标记的聚合物,避光保存.测定产物的红外光谱以确定结构.



Scheme 1 The syntheses of 4-azidobenzoic acid (a) and photoreactive copolymer P(LA-co-DAP) (b)

1.4 高压静电纺丝法制备聚合物纤维

分别将 1.5 g 光敏性聚合物 P(LA-co-DAP)

和空白聚合物 P(LA-co-DHP)溶解于 10 mL 氯仿,加入 5 mL 丙酮,配成质量分数为 7.4% 的溶

液,搅拌均匀配制成纺丝液,进行高压静电纺丝,在距离针头 15 cm 处,用载玻片收集纺丝纤维,分别制得载有光敏性聚合物和空白聚合物的载玻片。

1.5 牛血清白蛋白(BSA)的荧光标记

将 1.5 mg 异硫氰酸荧光素(FITC)溶解于 10 mL 碳酸盐缓冲液(1000 mL 缓冲液中含 NaHCO_3 7.56 g, Na_2CO_3 1.06 g, NaCl 7.36 g, pH 9.0)中,将 200 mg(0.003 mmol)牛血清白蛋白(BSA)溶解在 1.5 mL 三级蒸馏水中,并在充分搅拌的条件下逐滴加入 FITC 溶液中,室温下避光反应 2 h. 反应完成后,将反应液在 PBS 缓冲液(pH 7.4)中透析 3 天,除去未反应 FITC,然后冷冻干燥,4℃ 储存备用。

1.6 FITC-BSA 与聚合物纤维的光照偶联

蛋白质在光亲和聚合物表面偶联的示意图如

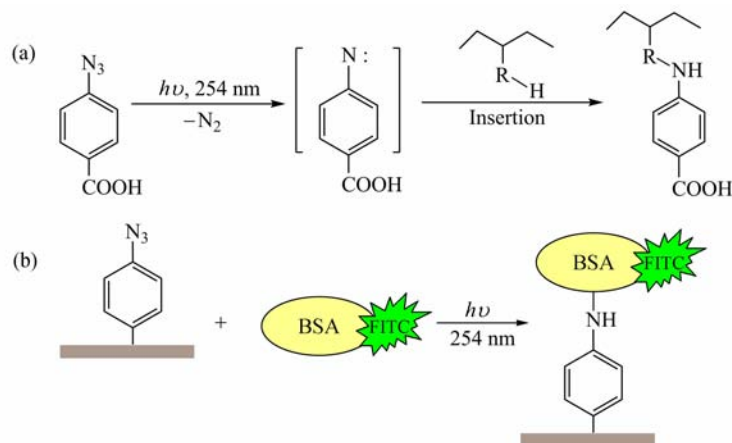


Fig. 1 (a) The reaction mechanism of 4-azidobenzoic acid photo-activation and nucleophilic insertion; (b) Schematic illustration of protein immobilization to the photoactive copolymer

1.7 带有端巯基的 mPEG 的合成

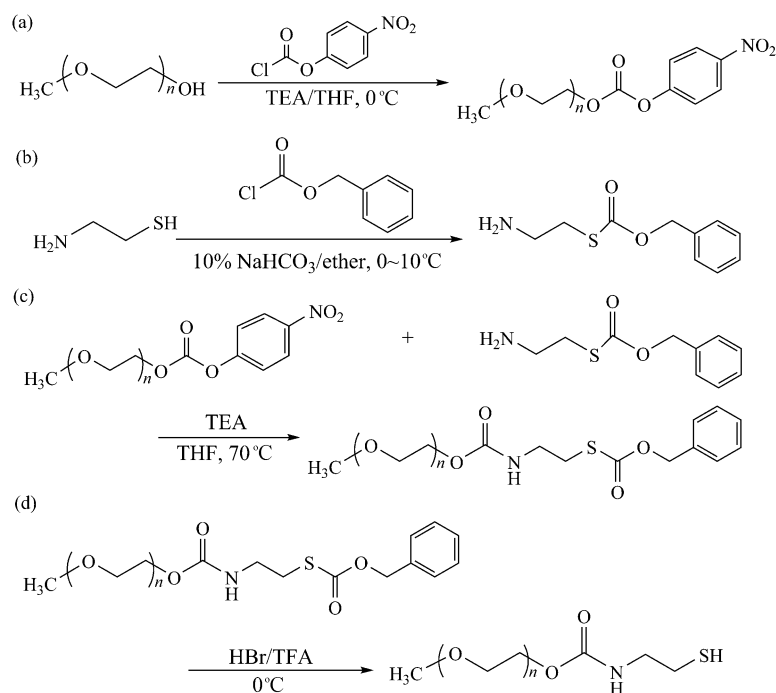
mPEG 的巯基化是采用四步反应完成,反应过程见示意图 2,包括:(a) PEG 羟基的活化,在 20 mL 干燥的 THF 中加入分子量为 2000 的 mPEG 1.0 g(0.5 mmol)和氯甲酸对硝基苯酯(NPC) 0.15 g(0.75 mmol),充分搅拌溶解,然后置于 0℃ 冰浴中,加入 0.1 mL 三乙胺(TEA),冰浴反应 10 h. 反应结束后过滤除盐,将滤液在乙醚中沉降,过滤收集,乙醚洗涤,真空干燥备用。(b) 巯基乙胺的巯基保护,首先称取巯基乙胺盐酸盐 3.18 g(0.028 mol)溶于 10% NaHCO_3 水溶液 50 mL 中,再加入 25 mL 乙醚,充分搅拌。在 0℃ 冰浴下迅速滴加 3.5 mL 氯甲酸苄酯(0.025 mol),反应 1 h,然后放置 10℃ 反应 48 h. 反应结束后停止搅拌,

图 1 所示. 叠氮苯甲酸的叠氮基团经光照激发,形成氮卡宾活性中间体(图 1(a)),而蛋白质分子表面带有羟基、羧基、氨基、巯基等多种亲核反应基团,与氮卡宾中间体发生亲核插入,将蛋白质偶联在修饰了光亲和标记的聚合物分子上(图 1(b)). 将 FITC-BSA 溶于 PBS 缓冲液中配制成 5 mg/mL 溶液(pH 7.4),分别将载有光敏聚合物纤维和空白聚合物纤维的玻片浸入 FITC-BSA 溶液中,避光吸附 5 min 后,将玻片从溶液中取出,置于 254 nm 紫外光灯下照射 2 min,然后用 PBS 溶液清洗玻片 5 次,将纤维表面的游离蛋白质洗掉. 在玻片表面滴一滴甘油,用盖玻片贴附在纤维玻片表面,然后用激光共聚焦显微镜观察. 这两种纤维经 FITC-BSA 避光吸附后不经紫外光照所获得的纤维作为对照,进行同样的观察。

在水和乙醚的分界面处可见大量白色沉淀,即苄氧羰基保护的巯基乙胺 Cysteamine-Z,过滤收集,乙醚洗涤,真空干燥备用。(c) mPEG-NPC 和巯基乙胺的偶联,羟基经过 NPC 活化的 mPEG 可以很容易地与氨基发生反应,将 Cysteamine-Z 偶联在 mPEG 的端羟基上. 具体操作是将 0.45 g mPEG-NPC(约 0.2 mmol)与 0.015 g Cysteamine-Z(约为 0.5 mmol)溶解于 THF 中,加入 TEA 0.1 mL, 70℃ 反应 24 h. 乙醚沉降得到产物 mPEG-Cysteamine-Z,真空干燥。(d) 巯基脱保护,mPEG-Cysteamine-Z 的脱保护是用溴化氢来实现的. mPEG-Cysteamine-Z 溶于三氟乙酸(0.04 g/mL)中,再慢慢加入相当于共聚物中 Cysteamine-Z 摩尔量的 4 倍的 33% 的 HBr 的醋酸溶液,用氮气换

气 3 次后,反应物 0℃ 搅拌反应 1.5 h. 反应完成后,用过量乙醚沉降、洗涤,得到脱保护后的产物.

40℃ 下真空干燥 24 h 即得到巯基化产物 mPEG-SH. 最终收率为 47%.



Scheme 2 Synthesis of thiol-mPEG

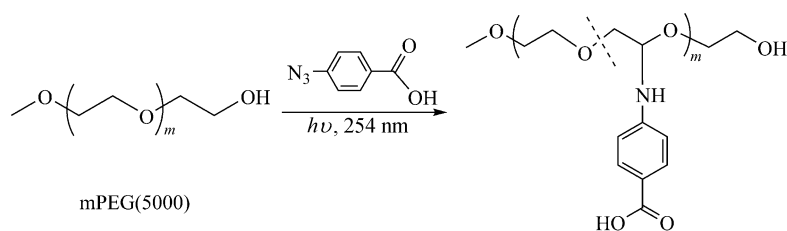
(a) The hydroxyl group of mPEG was activated by NPC; (b) Thiol group of cysteamine was protected by benzoxycarbonyl; (c) Coupling reaction; (d) Deprotection of the thiol group

1.8 mPEG 链的光亲和探针修饰

将合成的对叠氮苯甲酸 0.2 g 和 0.1 g mPEG ($M_n = 5000$) 共同溶解于 10 mL DMSO 溶剂中,以 DMSO 溶剂为参比,测定溶液的紫外光谱. 在波长为 254 nm 的紫外灯下一边搅拌一边进行光照反应,分别在反应时间为 1、5、10、20、30、40、50、60、

120、180 min 时取样,测定反应液的紫外光谱变化情况.

反应液在 DMSO 中透析 1 天,然后在蒸馏水中透析 2 天,除去未反应的对叠氮苯甲酸,取出产物冷冻干燥. 对叠氮苯甲酸与 mPEG 的光照偶联反应如示意图 3 所示.



Scheme 3 The photoactivated coupling reaction of 4-azidobenzoic acid and mPEG

1.9 PEG 自组装膜与对叠氮苯甲酸的反应

将 mPEG-SH 配制成浓度为 1 mmol 的水溶液,用蒸馏水作为背景并采集基线后,将 mPEG-SH 溶液注入 FT-SPR 样品池中,使 mPEG-SH 通过巯基在金片表面进行自组装,24 h 后用蒸馏水清洗,测定组装在金膜表面的 mPEG-SH 的 FT-SPR 响应信号值,以确定 mPEG-SH 是否成功组装在金表面.

将 mPEG-SH 修饰的金膜浸入光亲和探针对叠氮苯甲酸的 THF 溶液 (1 mmol/L) 中,然后在室温下挥发溶剂,再用真空抽干,使金膜表面附上一对叠氮苯甲酸分子. 将金片置于中心波长为 254 nm 的紫外灯下,以距光源 5 ~ 8 cm 的距离照射金片 10 min,然后将金片浸入 THF 中,使未反应的探针分子溶解于 THF 中,然后用 THF 和蒸馏水交替清洗金片, N_2 吹干,获得光亲和修饰的

PEG 表面(AZ-mPEG-SH).

1.10 FT-SPR 检测自组装 PEG 膜表面的蛋白质吸附作用

将浓度为 0.2 mg/mL 的 BSA 水溶液注入 FT-SPR 样品池,分别测定 BSA 在 mPEG-SH 及 AZ-mPEG-SH 自组装表面的吸附和洗脱过程.

2 结果与讨论

2.1 光亲和探针及共聚物的红外光谱

对氨基苯甲酸在叠氮化的过程中释放出 N_2 , 产生大量气泡,表明反应的发生. 收集纯化的产物,收率为 89.8%. 红外光谱中,对氨基苯甲酸(图 2(a))在 3461 cm^{-1} 和 3364 cm^{-1} 处的氨基峰消失,出现了 2107 cm^{-1} 处的叠氮基团特征峰,表明得到了 4-叠氮苯甲酸(图 2(b)). 将其与双羟基聚合物 P(LA-co-DHP)(图 2(c))酯化后,出现 2130 cm^{-1} 处的叠氮特征峰,证实了已经成功地通过酯化缩合将叠氮基团引入聚合物中,得到了带有光敏探针的共聚物 P(LA-co-DAP)(图 2(d)). 接枝前的聚合物 P(LA-co-DHP)中—OH 含量为 5.52%^[20],合成收率为 91.2%,将叠氮苯甲酸接枝前后聚合物核磁谱图中苯环特征峰进行对比,计算得出叠氮苯甲酸相对于—OH 的接枝率为 28.5%.

2.2 荧光标记蛋白质与光敏聚合物纤维的光照偶联

两种聚合物(带 AZ 侧基的 P(LA-co-DAP)和

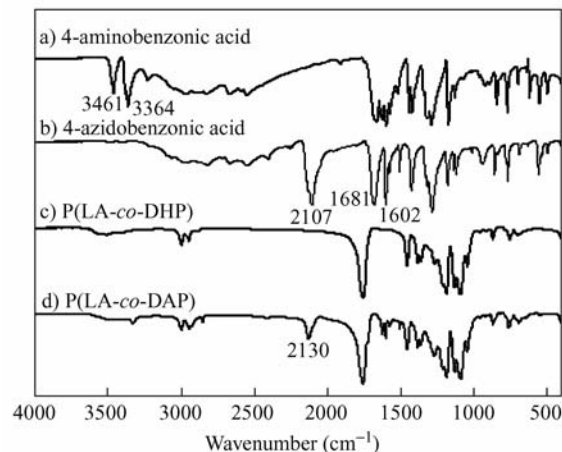


Fig. 2 FTIR spectra of (a) 4-aminobenzoic acid, (b) 4-azidobenzoic acid, (c) P(LA-co-DHP) and (d) P(LA-co-DAP)

未经修饰的 P(LA-co-DHP))纤维上滴加荧光蛋白溶液后,分别进行了光照和避光的实验,图 3 结果可以很清楚的看到,不带 AZ 侧基的空白聚合物纤维无论光照(图 3(II-a))还是避光反应(图 3(II-b)),都看不到荧光信号,说明蛋白质的偶联反应没有发生. 在聚合物珠上有痕量的荧光信号,这是由于聚合物表面非特异性吸附的蛋白质未能洗净造成的. 携带 AZ 侧基的聚合物纤维,在避光反应的条件下同样几乎看不到绿色荧光(图 3(I-b)),而经光照反应后带有均匀绿色荧光(图 3(I-a)). 这表明对叠氮苯甲酸侧基经过紫

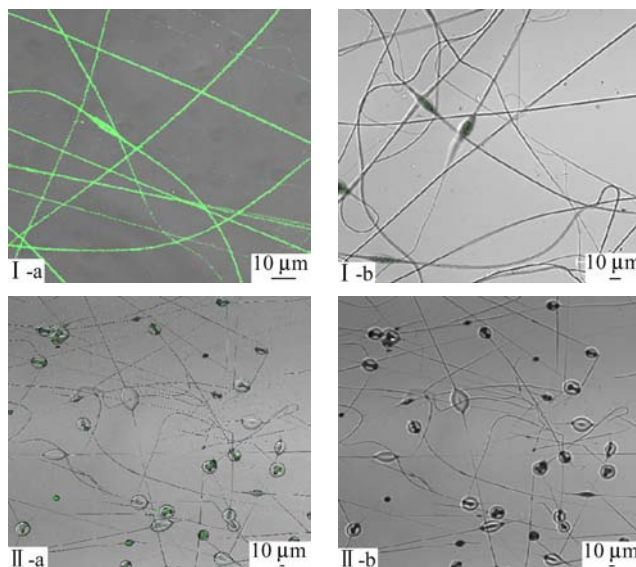


Fig. 3 CLSM observation of FITC-BSA immobilization on the photoactive fibers

Row I was for the photoactive fibers of P(LA-co-DAP); II was for the blank control of non-photoactive fiber of P(LA-co-DHP); Column a was for the UV irradiation test and b was for the negative control in darkness.

外光照激发后产生了活性中间体,很容易的将荧光标记的蛋白质偶联在纤维表面,而这种偶联的两个基本条件,叠氮苯基和紫外光照,缺一不可.

2.3 mPEG 巯基化产物的合成与表征

由图 4(A) 可见, mPEG 分子用 NPC 活化以后, $^1\text{H-NMR}$ 在 $\delta = 7.37 \sim 7.42$ 处出现了苯环的特征峰, FT-IR 谱(图 4(B)) 中羟基峰的吸收明显降低, 并出现了 1769 cm^{-1} 的羰基吸收峰, 表明 mPEG 分子的端羟基已被 NPC 基团所活化.

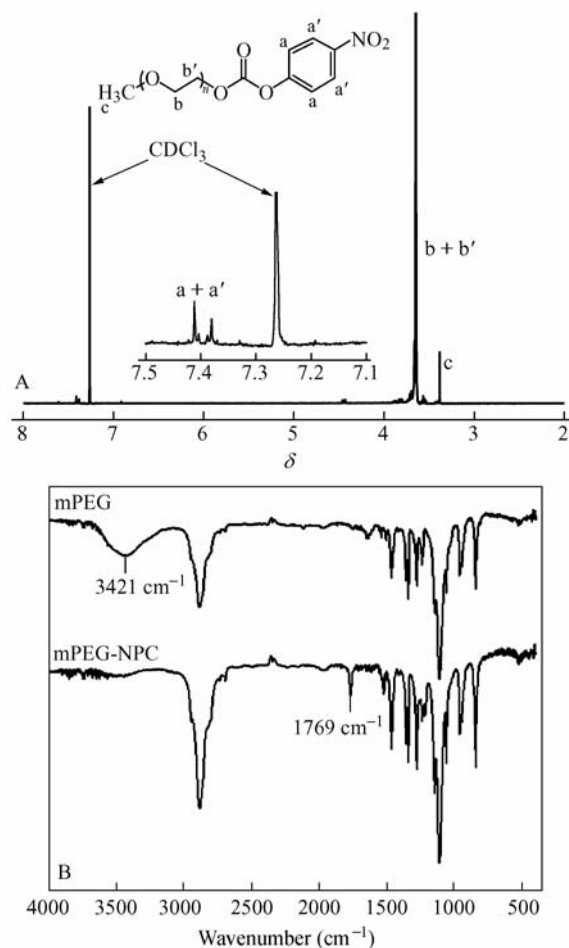


Fig. 4 $^1\text{H-NMR}$ (A) and FTIR (B) of the NPC-activated mPEG

巯基乙胺的巯基用氯甲酸苄酯保护后, 与 mPEG-NPC 进行酰胺化缩合, 然后在 HBr 和 TFA 作用下脱去 Z 基保护, 得到巯基化的 mPEG. 由于端基含量较小, 难以进行 $^1\text{H-NMR}$ 和 FTIR 检测, 我们采用 ICP-OES 方法测定了 S 元素在产物中的含量为 0.7%. 假设 mPEG 完全巯基化, 则 S 的理论含量为 1.5%, 因此得到 mPEG 的巯基修饰产率为 47%.

2.4 mPEG 链的光亲和探针修饰

通过紫外光照射, 光敏感探针的叠氮基团与 mPEG 进行光照亲和反应(示意图 3), 反应前溶液的紫外吸收峰在 272 nm 处, 吸光度达到 1.78. 由于 mPEG 没有紫外吸收, 因此溶液的紫外吸收全部来自对叠氮苯甲酸分子中叠氮基团和苯环的共轭体系. 随着光照反应时间的延长, 272 nm 处的光吸收显著下降, 表明叠氮基团含量降低, 暗示叠氮基团逐渐转变为氨基(图 5). 光照产物的

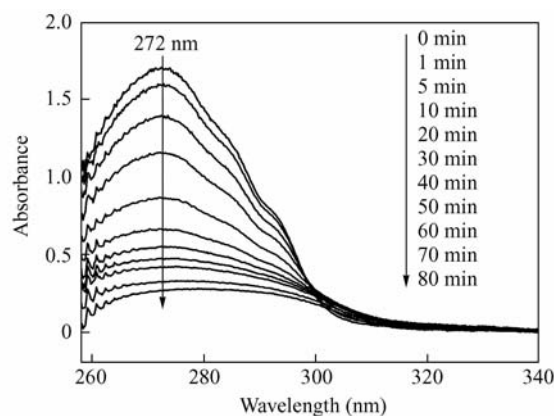


Fig. 5 Absorbance decrease during the reaction of 4-azidobenzoic acid with mPEG under 254 nm irradiation

$^1\text{H-NMR}$ 谱图中在 $\delta = 6.9$ 和 7.6 处出现苯环峰(图 6), 更直接地表明了苯甲酸基团已经被偶联到 mPEG 分子链上.

除了溶液反应之外, 我们还进行了固相反应, 即首先通过巯基与金之间的特殊相互作用将 mPEG-SH 组装到金膜表面, 然后上面涂覆一层对叠氮苯甲酸, 最后室温紫外光照, 并洗去未反应的对叠氮苯甲酸. 由于 mPEG-SH 几乎是单分子层, 非常薄, 反应又在 mPEG-SH 的表面进行, 难以跟踪反应的进行和确认反应产物的结构和含量, 故采用一种特殊的表征方法——傅里叶变换-表面等离子体共振(FT-SPR)来证明叠氮苯甲酸与 mPEG-SH 的反应, 即通过测定 mPEG-SH 表面吸附蛋白质的能力的变化来反推偶联反应的发生. 图 7 给出了用 FT-SPR 方法测定的白蛋白 BSA 在裸金表面、mPEG-SH 自组装膜表面以及 AZ 修饰的 mPEG-SH 膜表面的吸附曲线和洗脱曲线. 经过一个吸附-洗脱循环, 裸金表面吸附很多 BSA(图 7(a)), 而 mPEG-SH 膜表面的吸附量很小(图 7(c)), 它们的 FT-SPR 响应值分别为 83 和 2 cm^{-1} . 如此大的差别反映了聚氧乙烯的高度亲水性和与水

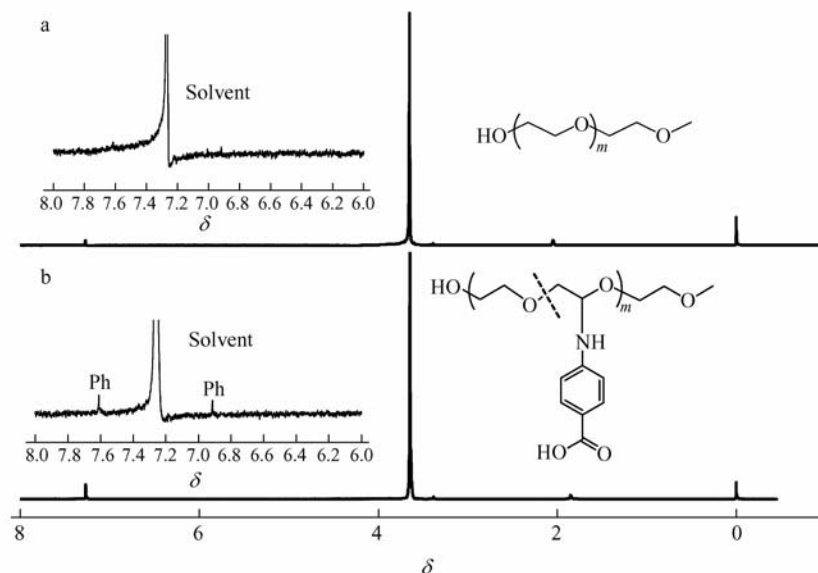


Fig. 6 ^1H -NMR spectra of mPEG (a) and AZ-mPEG(b)

分子缔合的能力,以及聚氧乙烯链的高度柔韧性和运动能力,一般的蛋白质分子无法靠近,很少吸附.聚氧乙烯的这一特性使它在生物医学领域有着特殊的意义和应用. mPEG-SH 膜表面用对叠氮苯甲酸修饰后,如图 7(b)所示,FT-SPR 响应值变为 33 cm^{-1} ,介于裸金膜和 mPEG-SH 膜之间.这种变化归咎于对叠氮苯甲酸对 mPEG-SH 膜的修饰.如示意图 3 所示,由于苯基叠氮的很强的反应性,羧基苯氨基直接接在 PEG 链的碳原子上,这影响了 PEG 链的蛋白质阻抗功能:COOH 的引入增加了对蛋白质中 NH_2 等基团的吸引力,苯环的引入增加了对蛋白质中疏水区的相互作用,这些都有利于蛋白质的吸附.所以,FT-SPR 所揭示的表面吸附功能的增强,证明了对叠氮苯甲酸在 mPEG-SH 膜表面的有效修饰,也就是说,在固相条件下也发生了示意图 3 所示的液相偶联反应.

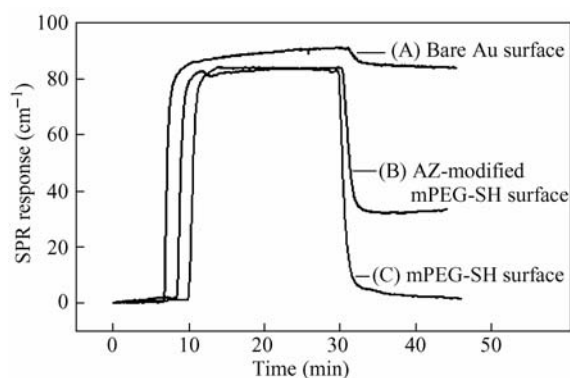


Fig. 7 Comparison of BSA adsorption on bare Au surface (a), AZ-modified mPEG-SH surface (b) and mPEG-SH surface (c)

这里应当特别指出,本文的目的不是通过引入羧基苯氨基来增强 PEG 的蛋白质阻抗功能,而是通过此种方法来引入功能侧基,例如 COOH. 因为 PEG 分子链上除了端羟基外没有任何通常意义上的可反应基团,因而它的化学修饰是很困难的,只能采用特殊的功能化环氧单体与氧乙烯通过阴离子聚合来引入侧基. 本文在溶液和固相条件下,实现了光活性的对叠氮苯甲酸与聚氧乙烯的偶联,从而在分子链上引入苯甲酸基团,反应简单、温和、有效,比起阴离子聚合等方法具有明显的特点和优势. 通过苯甲酸基团,可以进一步在 PEG 分子链上引入其它的功能基团或生物分子,则是不言而喻的.

3 结论

本文合成了光亲和标记分子对叠氮苯甲酸,并将其偶联至可降解聚合物 P(LA-co-DHP) 侧链上,形成具有光活性基团的可生物降解聚合物 P(LA-co-DAP),在紫外光照射下 5 min 内将蛋白质偶联到聚合物纤维表面. 此种蛋白质在聚合物表面快速共价偶联的方法,为蛋白质的固定及实时检测提供了简便快速的新方法,可以极大地缩短实验时间.

由于 PEG 分子链上除端基外不带有任何可反应基团,因此在 PEG 链中进行化学修饰引入功能基团非常困难. 本文采用了光亲和标记的方法,分别在溶液和固相条件下将对叠氮苯甲酸与 PEG 反应,在 PEG 链段上引入 PhCOOH 功能基

团,实现了 PEG 链的功能化. 这为 PEG 链段的修饰提供了一种方便快捷的方法,也为缺少可反应基团的其它聚合物链的功能化和智能化修饰提供了一种新途径.

REFERENCES

- 1 Chan K C, Singh A, Thornton E, Westheimer F. *J Biol Chem*, 1962, 237(9): 3006 ~ 3008
- 2 Hatanaka Y, Sadakane Y. *Curr Top Med Chem*, 2002, 2(3): 271 ~ 288
- 3 Fleming S. *Tetrahedron*, 1995, 51(46): 12479 ~ 12520
- 4 Kotzyba-Hilbert F, Kapfer I, Goeldner M. *Angew Chem Int Ed Engl*, 1995, 34(12): 1296 ~ 1312
- 5 Dorman G, Prestwich G. *Trends Biotechnol*, 2000, 18(2): 64 ~ 77
- 6 Keana J, Cai S X. *J Org Chem*, 1990, 55(11): 3640 ~ 3647
- 7 Brunner J, Senn H, Richards F M. *J Biol Chem*, 1980, 255(8): 3313 ~ 3318
- 8 Hashimoto M, Hatanaka Y. *Anal Biochem*, 2006, 348(1): 154 ~ 156
- 9 Dankbar D, Gauglitz G. *Anal Bioanal Chem*, 2006, 386(7-8): 1967 ~ 1974
- 10 Vodovozova E. *Biochemistry (Moscow)*, 2007, 72(1): 1 ~ 20
- 11 Zhu, A P, Zhang M, Wu J, Shen J. *Biomaterials*, 2002, 23(23): 4657 ~ 4665
- 12 Luo Xianglin(罗祥林), Huang Jia(黄嘉), He Bin(何斌), Le Yilun(乐以伦). *J Biomed Eng(生物医学工程学杂志)*, 2000, 17(3): 320 ~ 323
- 13 Becker S. *BBA-Protein Struct M*, 1996, 1293(2): 277 ~ 283
- 14 Han S Y, Choi S H, Kim M H, Lee W G, Kim S H, Min Y K, Kim B T. *Tetrahedron Lett*, 2006, 47(17): 2915 ~ 2919
- 15 Lebedeva N A, Rechkunova N I, Khodyreva S N, Favre A, Lavrik O I. *Biochem Bioph Res Co*, 2002, 297(4): 714 ~ 721
- 16 Chee G L, Yalowich J C, Bodner A, Wu X, Hasinoff B B. *Bioorgan Med Chem*, 2010, 18(2): 830 ~ 838
- 17 Zeng J, Xu X Y, Chen X S, Liang Q Z, Bian X C, Yang L X, Jing X B. *J Control Release*, 2003, 92(3): 227 ~ 231
- 18 Hayashi A, Goto Y, Nakayama M, Sato H, Watanabe T, Miyata S. *Macromolecules*, 1992, 25(19): 5094 ~ 5098
- 19 Hu X L, Liu S, Chen X S, Mo G J, Xie Z G, Jing X B. *Biomacromolecules*, 2008, 9(2): 553 ~ 560
- 20 Wei J Z, Yan L S, Hu X L, Chen X S, Huang Y B, Jing X B. *Colloid Surface B*, 2011, 83(2): 220 ~ 228

PEG MODIFICATION AND PROTEIN CONJUGATION BY VIRTUE OF 4-AZIDOBENZOIC ACID AS A PHOTOAFFINITY MOLECULE

WEI Jizheng^{1,2}, YANG Lixin¹, HU Xiuli¹, HUANG Yubin¹, CHEN Xuesi¹, JING Xiabin¹

(¹ State Key Laboratory of Polymer Physics and Chemistry, Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130022)

(² Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049)

Abstract A photoaffinity labeling molecule, 4-azidobenzoic acid, was synthesized and introduced into P(LA-co-DHP) to form a photoactive copolymer P(LA-co-DAP). Tests showed that proteins could be immobilized on the polymer fibers of P(LA-co-DAP) within 5 min through a photoaffinity reaction. This suggested potential applications of photoaffinity coupling in protein immobilization and protein detection. Furthermore, PEG and 4-azidobenzoic acid were reacted in solution under UV irradiation to achieve the modification on PEG chains. The PEG molecules assembled on gold surface were reacted also with 4-azidobenzoic acid under UV irradiation. BSA adsorption test by FT-SPR showed that the 4-azidobenzoic acid moieties were successfully attached to the PEG segments so that the protein adsorption ability of the PEG surface was changed. In this way, functional groups like —PhCOOH were introduced onto PEG chains in a convenient and quick manner. This would offer a new method to achieve the modification of the polymers lacking of functional groups.

Keywords Photoaffinity labeling, Photoactive polymer, Protein immobilization, PEG modification