

水溶性苐与噻吩共聚物的合成及 蛋白质对其荧光猝灭的影响^{*}

柳露林 宋文利 张志勇 孙鹏飞 卢晓梅 范曲立^{**} 黄 维^{**}

(江苏省有机电子与信息显示重点实验室 南京邮电大学信息材料与纳米技术研究院 南京 210046)

摘 要 采用 Suzuki 偶合方法合成了含羧酸基团的新型阴离子型水溶性绿光的 9,9'-二丙酸钠苐 (DPF) 和噻吩 (TH) 共聚物, 聚合物分子量约为 9000 左右, 具有较好的水溶性 (5 mg/mL). 研究了共聚物在不同 pH 水溶液中的荧光性质, 结果表明当 pH < 4 时, 羧基以 COOH 形式存在, 造成共聚物溶解度降低并产生聚集, 荧光减弱; 当 pH > 4 时, 所含羧基解离程度增加, 水溶性增加, 链间聚集减少, 至其荧光强度增大. 在磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 中, 加入了不同电性蛋白质, 结果表明通过静电吸引的作用, 带正电荷的组蛋白能更有效猝灭共聚物荧光, 其最低的猝灭浓度可达到 5×10^{-8} mol/L.

关键词 水溶性共轭聚合物, 荧光猝灭, 蛋白质

共轭聚电解质材料具有良好的荧光效率和水溶性, 其光电性质对细微的外部环境变化十分敏感, 是一种良好的化学与生物传感材料^[1-3]. 现有的化学与生物传感荧光材料主要为红色和蓝色发光材料^[1,4], 而生物及化学检测需要各种颜色的荧光材料. 目前研究较多的共轭电解质材料主要为聚噻吩 (polythiophene), 聚对亚苯基亚乙烯基 (PPV), 聚对苯 (PPP), 聚苐 (polyfluorene) 等几类. 聚苐及其衍生物含有刚性平面内联苯单元, 化学稳定性好和热稳定性比较高, 且具有较高的荧光量子产率^[5], 是常用的有机发光材料. 通常聚苐有较大的带隙, 为典型的蓝光材料. 若在聚苐主链中引入低带隙的单体如杂环、多芳环或者芳杂环分子可增大聚合物骨架电子云的密度, 改变聚苐的发光颜色. 其中, 苐与噻吩共聚物是一种绿色电致发光材料, 具有较高的荧光效率、高稳定性以及高传输性能^[6,7]. 可以预见, 水溶性的苐与噻吩共聚物在生物传感方面也应具有潜在的应用价值.

本文设计合成了一种新型水溶性阴离子型绿光材料, 聚[9,9'-二丙酸钠苐-2,7-噻吩] (**P2**), 研究了溶液 pH 以及不同电性的蛋白质对其荧光

性质的影响, 表明其在生物传感方面具有潜在的应用价值.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

2,7-二溴苐 (98%)、KOAc、双苐酰二硼 (99%)、四丁基溴化胺 (96%)、2,5-二溴噻吩 (98%)、1,6-正己烷 (98%) 均购自上海晶纯实业有限公司, [Pd(dppf)₂Cl₂] 购自 Aldrich Chemical, 其它常见化学试剂和溶剂均购自中国医药集团(上海)化学品试剂公司, 未经处理直接使用. 组蛋白 histone、牛清白蛋白 BSA、血红蛋白 hemoglobin 均购自上海生工. 凝胶渗透色谱 (GPC) 在 Shimadzu LC-10A VP 型色谱仪上测定, 以聚苯乙烯为标准参比物, 以四氢呋喃 (THF) 为淋洗液, 紫外可见和荧光检测采用岛津紫外吸收光谱仪 UV-3600 和荧光光度计 RF-5301PC.

1.2 合成

单体 **M1** 和单体 **M2** 根据参考文献[8]合成.

聚合物 **P1** (合成步骤见示意图 1): **M1** (272 mg, 0.47 mmol)、2,5-二溴噻吩 (7.26 mg, 0.03 mmol) 和 **M2** (340 mg, 0.5 mmol) 的干燥甲苯 (15

^{*} 2010-06-23 收稿, 2010-08-23 修稿; 国家重点基础研究发展计划资助 (973 计划, 项目号 009CB930600)、国家自然科学基金 (基金号 90406021, 20874048)、霍英东青年教师基金 (基金号 111051)、高等学校博士点专项科研基金 (基金号 20093223110003)、江苏省自然科学基金 (基金号 BK2008453) 和江苏省高校“青蓝工程”资助项目; ^{**} 通讯联系人, E-mail: iamqlfan@njupt.edu.cn;

iamwhuang@njupt.edu.cn

doi:10.3724/SP.J.1105.2011.10159

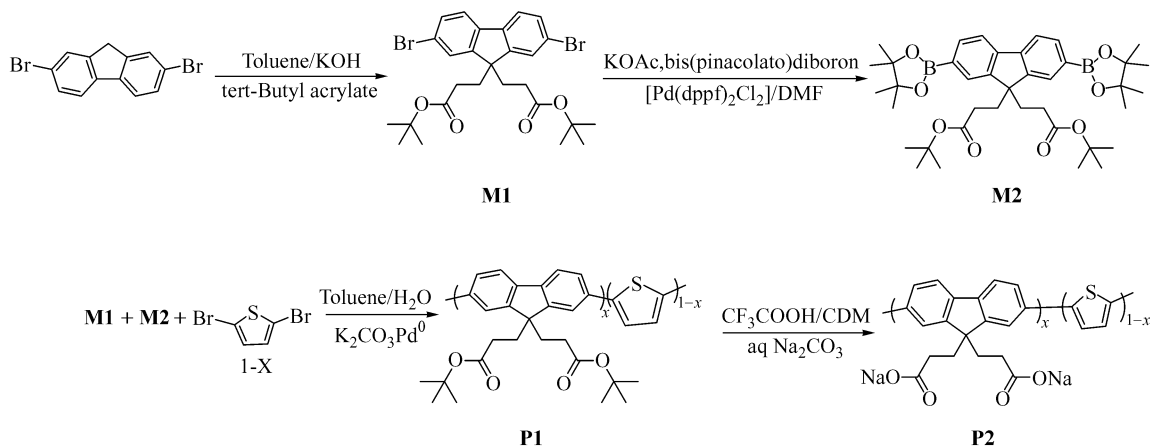
mL) 中,在氮气保护条件下,迅速加入 $[\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4]$ (30 mg),加热至 85°C ,混合液搅拌 72 h. 反应结束后,将混合物倒入水中, CH_2Cl_2 萃取 3 次, MgSO_4 干燥,过滤,浓缩,然后滴入甲醇/水 (10:1) 的混合溶剂中 (300 mL),有丝状沉淀产生,搅拌 2 h 后,过滤收集沉淀,将其溶解于少量的 CH_2Cl_2 中,滴入大量甲醇 (300 mL) 中沉降,如此反复沉降 2 次,最后得到纤维状固体,在室温下真空干燥 (340 mg, 82%). GPC 测试表明,聚合物重均分子量 $M_w = 12600$, $M_n = 9200$,分子量分布 $d = 1.37$.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , δ): 7.86 ~ 7.71 (br m, 6H), 7.49 (s, 0.15H), 2.535 (br s,

4H), 1.702 (br s, 4H), 1.30 (s, 18H); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , δ): 172.82, 149.24, 140.67, 128.88, 127.21, 121.66, 120.44, 80.12, 77.36, 53.99, 34.76, 30.13, 28.04

苜-co-噻吩共聚物 **P2**: **P1** (30 mg) 溶于 (25 mL) 二氯甲烷,滴加三氟乙酸 (2 mL),室温搅拌 12 h,旋干有机溶剂得到黄绿色固体,用 Na_2CO_3 水溶液 (0.005 mol/L, 30 mL) 中室温搅拌 4 h,去离子水透析提纯 3 天,干燥得到黄绿色固体 **P2** (23 mg, 62%).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD , δ): 7.63 ~ 7.87 (m, 6H), 7.49 (s, 0.15H), 2.63 (br s, 4 H), 1.65 (br s, 4H).



Scheme 1 Synthesis of the copolymers of fluorene and thiophene

2 结果与讨论

2.1 紫外-可见吸收和荧光发射光谱

稀溶液中,单体浓度为 ($[\text{RU}] = 2 \times 10^{-6}$ mol/L),苜-co-噻吩共聚物 **P2** 的紫外-可见吸收和荧光发射光谱如图 (图 1). 红色线为其紫外-可见吸收光谱,发现共聚物 **P2** 的最大吸收峰值为 381 nm,是由聚合物 **P2** 苜主链 $\pi-\pi^*$ 跃迁产生^[9],由于噻吩单元含量较少,噻吩单元吸收较弱,吸收主要由苜单元贡献. 图 1 中黑色线为共聚物的荧光发射光谱. 共聚物 **P2** 发射绿光,其最大发射峰为 446 nm,在 464 nm 处有一个振动肩峰. 聚合物 **P2** 的紫外-可见吸收和发射光谱特征峰型与已报道的苜-co-噻吩共聚物的峰型相似^[10];相对聚苜的吸收和发射光谱,聚合物 **P2** 的最大发射峰位置出现了明显红移^[8],说明少量低带隙的噻吩掺杂改变了聚苜主链骨架电子云的密度.

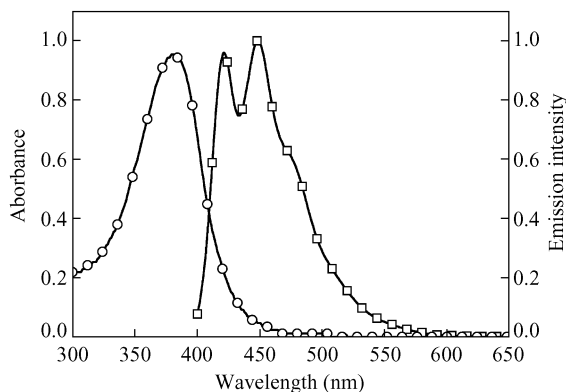


Fig. 1 The UV-Vis and photoluminescence spectra of copolymer **P2** in water

2.2 溶液 pH 值对聚合物荧光的影响

苜-co-噻吩共聚物 **P2** 侧链为丙酸盐,据文献^[8,11]推测丙酸 pK_a 值在 4 左右. 通过在不同 pH 值水溶液中,研究了聚合物的吸收和荧光发射光谱的变化. 实验表明聚合物 **P2** 最大吸收峰的位

置基本不变,但吸收峰的强度改变较大. 溶液 pH 对聚合物荧光影响如图 2 所示. 在不同的 pH 条件下,聚合物的最大发射峰位置基本不变,聚合物 **P2** 的荧光发射强度变化明显. pH < 4 范围内,聚合物 **P2** 荧光很弱,并且在此范围内,改变溶液 pH 对聚合物荧光影响很小,因为 pH < 4 时,聚合物的茆单元挂接的羧酸基团绝大部分以 COOH 形式存在,导致茆-co-噻吩聚合物 **P2** 在水中的溶解度很小. 此外,强酸性条件促使羧酸基团质子化, H^+ 与聚合物侧链挂接的 COO^- 成键,将导致聚合物聚集,从而降低荧光效率^[8]. 在 pH = 4 ~ 7.4 范围内,随着溶液 pH 增大,聚合物 **P2** 的荧光变化呈增强趋势. 因为在此条件下,聚合物侧链的羧酸基团可能是 COO^- 和 COOH 共存状态,增大溶液 pH 值,打破 COO^- 和 COOH 的平衡,羧酸基团倾向形成 COO^- ,聚合物 **P2** 在水中溶解度增大且不易聚集,造成聚合物 **P2** 荧光增强. 当溶液呈弱碱性时,有利于聚合物的羧酸基团去质子化,此时聚合物的羧酸基团基本为 COO^- . 另外,由于聚合物侧链带负电,侧链之间互相排斥,有效减少聚合物链间聚集,聚合物荧光效率明显增强.

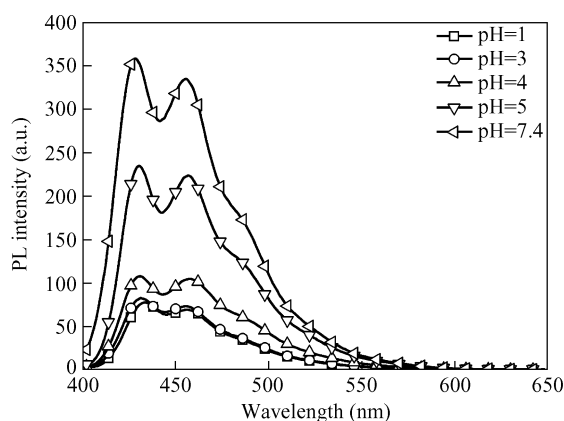


Fig. 2 Photoluminescence spectra of **P2** at different pH

2.3 蛋白质对聚合物荧光的影响

蛋白质等生物大分子与共轭聚合物相互作用,可改变聚合物的构象及聚集状态,从而导致聚合物光化学性质变化^[12,13],本文研究了不同电性的蛋白质对聚合物 **P2** 的荧光性质影响. 将茆-co-噻吩共聚合物 **P2** 溶解在磷酸盐缓冲溶液 (PBS) (pH = 7.2 ~ 7.4) 中,单体浓度为 ($[RU] = 2 \times 10^{-6}$ mol/L),然后分别加入蛋白质,研究不同电性蛋白质对茆-co-噻吩共聚合物 **P2** 荧光猝灭效果.

实验用到蛋白质有牛血清白蛋白 BSA、血红蛋白 hemoglobin、组蛋白 histone. 检测物的等电点

如下 (BSA; pI = 4.8 ~ 4.9), hemoglobin (pI = 7.0 ~ 7.4) 和 histone (pI = 11.7)^[12]. 蛋白质带电性取决于溶液 pH 值,在 PBS 中,牛血清白蛋白带负电荷,血红蛋白不带电荷,组蛋白带正电荷. 在聚合物 **P2** 的 PBS 中加入以上蛋白质后,带不同电性的蛋白质对聚合物 **P2** 荧光性质影响如图所示 (图 3). 由图 3 看出,在 PBS 中,加入浓度为 $c = 5 \times 10^{-8}$ mol/L 的带负电荷的牛血清白蛋白 BSA 后,蛋白质未造成聚合物 **P2** 的聚集,聚合物的荧光强度几乎不变. 这是由于牛血清白蛋白 BSA 和聚合物同样带负电荷,它们之间存在静电排斥作用,因此牛血清白蛋白 BSA 对共轭分子链间的积聚影响很弱,从而导致聚合物荧光不变. 加入相同浓度的不带电荷的血红蛋白,聚合物荧光有部分降低,这可能是血红蛋白是金属蛋白,电子/电荷能从聚合物 **P2** 转移到血红蛋白,造成聚合物荧光减弱^[12]. 当加入浓度为 $c = 1 \times 10^{-8}$ mol/L 的组蛋白时,聚合物的荧光强度明显降低,只有原来 25% 左右. 由于在 PBS 中,组蛋白带很强的正电荷,其能与带负电荷的聚合物 **P2** 产生强烈的静电吸引,导致聚合物 **P2** 共轭链聚集,产生聚合物荧光猝灭效果^[14]. 实验表明,在 PBS 中,带正电荷的组蛋白能更有效地猝灭茆-co-噻吩共聚合物 **P2** 的荧光.

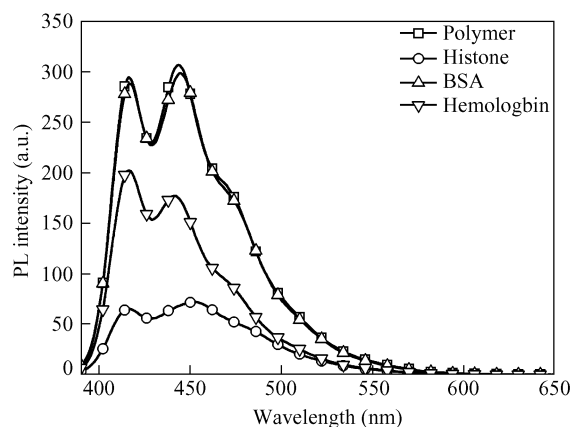


Fig. 3 Photoluminescence spectra of **P2** with different proteins in PBS buffer

[proteins] = 5×10^{-8} mol/L

进一步研究了组蛋白浓度对聚合物 **P2** 荧光的影响. 相同实验条件下,分别加入不同浓度 ($0 \sim 1 \times 10^{-7}$ mol/L) 的组蛋白,研究聚合物 **P2** 的荧光变化,实验结果如图 (图 4) 所示. 发现微量的组蛋白会导致聚合物 **P2** 荧光明显变化,并随着组蛋白浓度增加,聚合物 **P2** 荧光呈逐渐减弱趋势,

当加入的组蛋白浓度达到 $c = 1 \times 10^{-7}$ mol/L 时, 聚合物荧光基本不再下降。

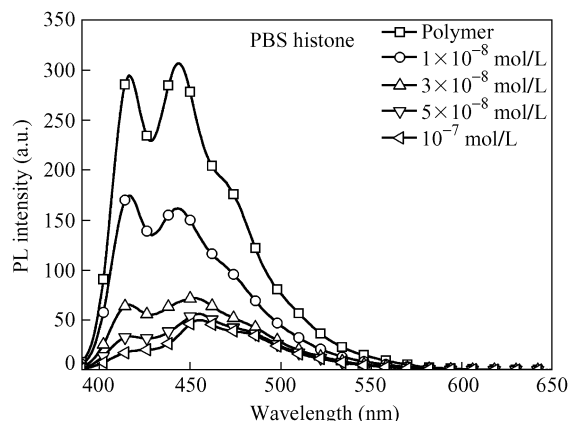


Fig. 4 Photoluminescence spectra of **P2** in PBS buffer with successive addition of histone

[histone] = $0 \sim 10^{-7}$ mol/L

阴离子型水溶性聚[9,9'-二丙酸钠苜-2,7-*co*-噻吩]**P2**,其具有较高分子量(约为 9000)和良好的水溶性(约 5 mg/mL)。紫外和荧光发射光谱表明共聚物 **P2** 发射绿光,最大发射峰为 446 nm。进一步研究了溶液 pH 对其荧光影响,pH = 4 ~ 7.4 范围内,聚合物 **P2** 的紫外吸收和荧光发射强度随着溶液 pH 增大而增强,但在 pH < 4 时,聚合物荧光强度变化不大,因为此时聚合物成聚集状态。在 PBS 中(pH = 7.2 ~ 7.4),加入不同电性的蛋白质,结果表明带正电荷的组蛋白能更有效造成共聚物荧光猝灭,且荧光猝灭程度随加入组蛋白浓度的增加而增加。这是由于带正电的组蛋白能与带负电荷的聚合物 **P2** 产生强烈的静电吸引,导致聚合物 **P2** 聚集,从而导致聚合物荧光猝灭。综上所述,苜与噻吩共聚物是一类很具潜力的生物传感材料。

3 结论

采用钯催化的 Suzuki 偶合方法合成出新型

REFERENCES

- 1 Zhou G, Qian G, Ma L, Cheng Y X, Xie Z Y, Wang L X, Jing X B, Wang F S. *Macromolecules*, 2005, 38: 5416 ~ 5424
- 2 Stork M, Gaylord B S, Heeger A J, Bazan G C. *Adv Mater*, 2002, 14: 361 ~ 366
- 3 Harrison B S, Ramey M B, Reynolds J R, Schanze K S. *J Am Chem Soc*, 2000, 122: 8561 ~ 8562
- 4 McQuade D T, Pullen A E, Swager T M. *Chem Rev*, 2000, 100: 2537 ~ 2574
- 5 Stephan O, Vial J C. *Synth Met*, 1999, 106: 115 ~ 119
- 6 Tang W H, Ke L, Tan L W, Lin T T, Kietzke T, Chen Z K. *Macromolecules*, 2007, 40(17): 6164 ~ 6171
- 7 Veres J, Ogier S D, Leeming S W, Cupertino D C, Khaffaf S M. *Adv Funct Mater*, 2003, 13(3): 199 ~ 204
- 8 Zhang Y, Liu B, Cao Y. *Chem Asian J*, 2008, 3: 739 ~ 745
- 9 Wang F K, Bazan G C. *J Am Chem Soc*, 2006, 128: 15786 ~ 15792
- 10 Vamvounis G, Schulz L, Holdcroft S. *Macromolecules*, 2004, 37: 8897 ~ 8902
- 11 Nachod F C, Zuckerman J J. *Determination of Organic Structures by Physical Methods*. New York: Academic Press, 1972. 713 ~ 732
- 12 Kim I B, Dunkhorst A, Bunz U F. *Langmuir*, 2005, 21: 7985 ~ 7989
- 13 Huang F, Wang X H, Wang D L, Yang W, Cao Y, Huang F. *Polymer*, 2005, 46: 12010 ~ 12015
- 14 Bronich T K, Nguyen H K, Eisenberg A, Kabanov A V. *J Am Chem Soc*, 2000, 122: 8339 ~ 8343

SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF A WATER-SOLUBLE POLY(FLUORENE-*co*-THIOPHENE) AND ITS FLUORESCENCE QUENCHING BY PROTEINS

LIU Lulin, SONG Wenli, ZHANG Zhiyong, SUN Pengfei, LU Xiaomei, FAN Quli, HUANG Wei

(*Institute of Advanced Materials (IAM), Nanjing University of Posts and Telecommunications, Nanjing 210046*)

Abstract An anionic water-soluble polymer was synthesized by Suzuki-coupling between 2,7-[bis(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)-9,9-bis(3-(tert-butyl propanoate))]fluorene, 2,7-dibromo-9,9-bis(3'-(tert-butylpropanoate))fluorene, and 2,5-dibromothiophene, which was followed by treatment in trifluoroacetic acid and aqueous Na_2CO_3 to afford the functional carboxylic acid groups, with number-averaged molecular weight about 9000 and polydispersity of 1.37. The polymer emits green fluorescence with a main peak at around 446 nm and a shoulder at about 464 nm. The absorption and fluorescence spectra of the polymer are strongly dependent on pH value owing to the partial protonation of carboxylate groups and the aggregation of the polymer chains. The change in polymer fluorescence upon interaction with different proteins in phosphate buffer solution (PBS) was also studied. The difference between the proteins is that bovine serum albumin (BSA) is negatively charged, histone is positively charged and hemoglobin is neutral. Strong fluorescence quenching of the polymer was observed in the presence of histone, the lowest quenching concentration was observed to be 5×10^{-8} mol/L. Under similar experimental conditions, whereas weak quenching was observed in the other proteins hemoglobin and BSA. The variation in the fluorescence of the polymer in the presence of different proteins is due to the different electrostatic interactions between the polymer and the proteins.

Keywords Water-soluble conjugated polymer, Fluorescence quenching, Protein