

模仿绿色荧光蛋白的荧光聚合物的合成和光学性质研究*

邓洪平^{1,2} 朱 琦² 王大力² 朱邦尚¹ 朱新远^{1,2**}

(上海交通大学 ¹分析测试中心 ²化学化工学院 上海 200240)

摘 要 受绿色荧光蛋白(GFP)荧光增强原理启发,采用开环聚合制备了两亲性聚乙二醇-生色团-聚己内酯(PEG-c-PCL)嵌段聚合物.通过核磁共振氢谱和碳谱(¹H-,¹³C-NMR)、傅立叶变换红外光谱(FTIR)、凝胶渗透色谱(GPC)和紫外可见吸收光谱(UV-Vis)等证明其结构和性质.生色团和聚合物有相似的紫外吸收光谱,且最大吸收峰都在 371 nm.荧光发射光谱表明,生色团的发射峰在 427 nm,但聚合物的荧光发射峰出现了 6 nm 的红移,这是高分子化引起的结果.透射电镜(TEM)和动态光散射(DLS)证明了该两亲性嵌段聚合物能够组装成为纳米粒子.当聚合物组装成纳米粒子后,荧光强度增大了 55 倍,并且荧光发射峰出现了 14 nm 的红移,这些现象可归结于荧光生色团自由旋转的限制和组装导致的相互作用增强.

关键词 荧光聚合物,绿色荧光蛋白,自组装,成像

绿色荧光蛋白(GFP)具有许多优异和独特的光学性质,因而被广泛应用于细胞和分子生物学^[1-4].GFP 的光学性质与 5 个 α 螺旋和 1 个含 11 条链的 β 折叠所组成的自组装结构密切相关.其中, β 折叠通过分子内氢键形成筒状结构,而 α 螺旋恰好位于筒状结构的两端,形成了一个近似完美的圆柱体,从而限制了内部生色团的自由旋转^[5-7].当处于低级结构时,GFP 的荧光非常弱.然而,一旦形成了类似圆柱体的高级组装结构,荧光生色团的自由旋转受到极大限制,GFP 重新获得了优异的光学性质^[8,9].

在过去的 10 年里,有关 GFP 生色团的研究引起了有机化学家的极大兴趣.GFP 生色团的合成方法有 3 种,包括 Erlenmeyer 氮杂内酯法,Koevenagel 缩合法和 2,3-环加成法.其中,Erlenmeyer 氮杂内酯法是最为经典的制备 GFP 生色团及其类似物的合成方法^[10].Kojima 等^[11]通过 Erlenmeyer 氮杂内酯法制备了一系列 GFP 生色团类似物,考察了这些类似物的光学性质,并证明生色团光学性质受周围蛋白环境的影响.He 等^[12]也利用 Erlenmeyer 氮杂内酯法制备了一系列 GFP 生色团类似物,并通过增加共轭长度的方法,使其紫外吸收产生红移.Baldrige 等^[13]利用 Koevenagel 缩合反应制备了 GFP 生色团类似物,

并通过锌离子螯合提高了生色团的荧光性能.Lee 等^[14]利用 2,3-环加成法合成了一系列 GFP 生色团类似物,并将其用于检测.

虽然化学家制备了许多不同的 GFP 生色团及其类似物,但如何恢复其荧光性能成为巨大的挑战.Chen 等^[15]合成了间位取代的 GFP 生色团类似物,并利用生色团自身形成的分子内氢键,提高了荧光性能.Wu 等^[16]采用经典合成法,制备了一系列含硼的生色团类似物,利用硼原子固定生色团,限制其自由旋转,从而大幅度提高了这些生色团的荧光性能.Baldrige 等^[17]利用封装方法限制生色团的自由旋转,从而提高了生色团的荧光性质.当然,还有许多其它提高 GFP 生色团类似物光学性质的方法^[10].

事实上,GFP 本身是一个只含有单一生色团的生物大分子.当处于低级结构时,GFP 只具有微弱的荧光;一旦形成了近似圆柱体的结构,GFP 重新获得优异和独特的荧光性能.这个过程可以看作是一个生物自组装的过程,GFP 通过生物自组装大大增强了本身的光学性质.受这一现象启发,我们设计和合成了基于 GFP 生色团的两亲性嵌段聚合物,并且利用自组装方法增强了荧光性能.最后,具有良好荧光性质的聚合物纳米粒子被成功应用于细胞成像.通过模仿自然,我们制备了一

* 仿生高分子与材料专题报道;2012-04-01 收稿,2012-05-07 修稿;国家自然科学基金(基金号 21025417)和科技部重大研究计划(项目号 2009CB930400,2012CB821500)资助项目.

** 通讯联系人,E-mail:xyzhu@sjtu.edu.cn

doi:10.3724/SP.J.1105.2012.12089

类能够通过自组装增强荧光性质的新型荧光聚合物,并证明了这类荧光聚合物在细胞成像上具有良好应用前景.

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

1.1.1 试剂

己内酯(Alfa Aesar)用氢化钙干燥 48 h,减压蒸馏;辛酸亚锡(Alfa Aesar)直接使用;甲苯,分析纯,中国医药集团上海试剂公司,氢化钙回流后使用.其它溶剂及分析试剂均为分析纯级别.根据我们先前报道合成了生色团修饰的聚乙二醇单甲醚(PEG-c)^[18].

1.1.2 仪器

核磁共振波谱仪 MERCURY plus 400(美国 Varian 公司);凝胶渗透色谱(GPC) Series 200(美国 Perkin Elmer 公司);傅立叶变换红外光谱仪 Spectrum 100(美国 Perkin Elmer 公司);透射电子显微镜 JEM-2010(日本电子株式会社);PCS 纳米粒度分析仪 Zetasizer Nano S(英国 Malvern 公司);紫外-可见分光光度计 Lambda 20(Perkin Elmer 公司);荧光光谱 LS 50B 荧光磷光发光分光光度计(Perkin Elmer 公司);透析袋(MWCO = 3500 g/mol,上海绿鸟科技);细胞培养用耗材(美国 Corning 公司);倒置荧光显微镜 DMI6000B(德国 Leica).

1.2 聚乙二醇-生色团-聚己内酯(PEG-c-PCL)的制备

取 25 mL 反应瓶,氮气保护下除水.加入 220 mg(0.1 mmol) PEG-c,封口,用 10 mL 甲苯溶解,减压抽掉 3 mL 甲苯.再注入 2 mL 的 25 mg 辛酸亚锡甲苯溶液,搅拌 5 min,抽掉 2 mL 甲苯.最后,加入 0.85 mL(8 mmol)己内酯,抽掉 2 mL 甲苯后,于 80℃ 反应 46 h.反应结束后,直接用冰乙醚沉淀 2 次,得到黄色的固体,35℃ 真空干燥.产率 21%.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, 298 K, δ): 8.10 ~ 8.08 (d, Ar), 7.07 (s, CH =), 6.96 ~ 6.93 (d, Ar), 4.26 ~ 4.23 (t, COO—CH₂—), 4.18 ~ 4.16 (t, Ar—O—CH₂—), 4.07 ~ 4.02 (—OCO—CH₂—), 3.88 ~ 3.46 (—O—CH₂CH₂—), 3.37 (s, —OCH₃), 2.35 ~ 2.27 (—COOCH₂CH₂—),

1.68 ~ 1.55 (—COCH₂CH₂—, —COOCH₂CH₂—), 1.43 ~ 1.33 (—COCH₂CH₂CH₂—).

¹³C-NMR (400 MHz, CDCl₃, 298 K, δ): 173.6, 170.6, 160.7, 136.5, 134.2, 127.7, 127.2, 115.0, 72.0, 70.7, 69.7, 67.6, 64.2, 62.4, 61.9, 59.1, 39.7, 34.2, 32.4, 28.4, 25.6, 24.7, 15.9.

IR (KBr): 3444, 2945, 2892, 1727, 1645, 1602, 1513, 1468, 1360, 1344, 1281, 1243, 1191, 1180, 1148, 1113, 1061, 964, 842, 733, 610, 539, 531, 510 cm⁻¹.

GPC: $M_n = 3.7 \times 10^3$, $M_w/M_n = 1.26$.

1.3 光学性质研究

分别配制一定浓度的生色团和聚合物的四氢呋喃溶液,测定两者的紫外吸收和荧光发射光谱.再配制 2 mg/mL 聚合物的四氢呋喃溶液,待聚合物完全溶解后,取一定量的聚合物溶液滴加到水中,组装形成纳米粒子,并通过透析的方法除去四氢呋喃.同时,配制相同浓度聚合物的四氢呋喃溶液作为对照.

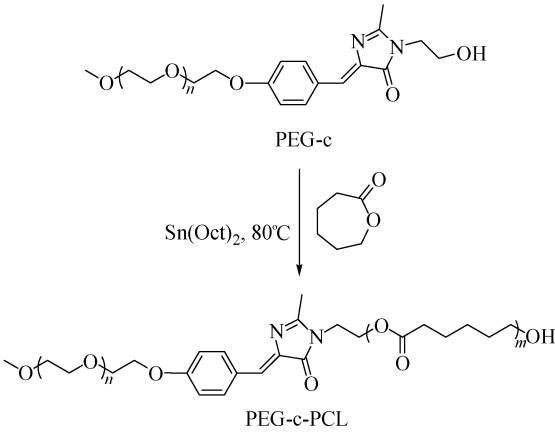
1.4 细胞成像

在含有胚胎牛血清以及青/链霉素双抗的 DMEM 培养基中培养人乳腺癌细胞(MCF-7 细胞).培养箱温度为 37℃,充满含 5% CO₂ 的潮湿空气.培养 24 h 以后,分别将生色团浓度为 20 μg/mL 的聚合物和对照生色团的 DMEM 溶液加入培养基中,在 37℃ 培养 6 h.培养基用磷酸缓冲液(PBS)洗 3 次后,用 10% 的甲醛固定细胞(室温 10 min),再用荧光显微镜观察(激发波长为 405 nm).

2 结果与讨论

2.1 聚乙二醇-生色团-聚己内酯(PEG-c-PCL)的制备和表征

参考我们先前的工作合成生色团修饰的聚乙二醇单甲醚(PEG-c)^[18].然后,在辛酸亚锡的催化作用下,以甲苯作为溶剂,利用 PEG-c 生色团的伯羟基引发己内酯开环聚合,一步反应成功制备了两亲性嵌段聚合物 PEG-c-PCL,如示意图 1 所示.由于大分子引发剂的活性比较低,这个反应进行的时间相对较长,为 46 h.考虑到生色团含有的五元氮杂环可能同辛酸亚锡作用,降低催化剂的活性,故应适当提高催化剂辛酸亚锡的用量.



Scheme 1 Synthetic route of PEG-c-PCL

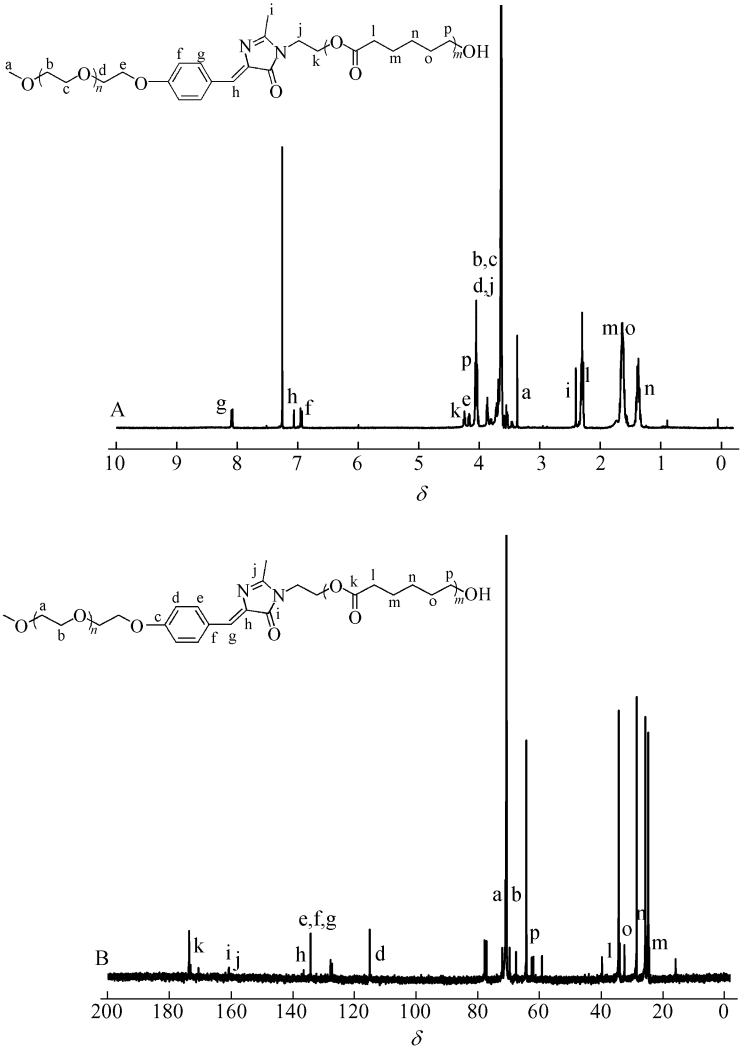


Fig. 1 NMR spectra of PEG-c-PCL: (A) ^1H -NMR and (B) ^{13}C -NMR

图 1 给出了所得聚合产物的核磁氢谱和碳谱. 从核磁氢谱中, 可以看到生色团特征峰分别位于 $\delta = 8.09, 7.07, 6.93$ 和 2.40 ; PEG 的亚甲基峰

在 $\delta = 3.64$ 左右; PCL 的特征峰分别在 $\delta = 4.05, 2.30, 1.66$ 和 1.37 , 并且特征峰积分比例为 $2:2:4:2$. 同样, 我们也可以在核磁碳谱上找到对应的

信号.

核磁分析充分证明我们合成了嵌段聚合物 PEG-c-PCL. 通过核磁氢谱积分, 计算出聚合物的数均分子量 (M_n) 为 3.6×10^3 , 这和 GPC 测试结果相吻合 ($M_n = 3.7 \times 10^3$). 对于开环聚合, PEG-c-PCL 的分子量分布 (PDI) 为 1.26, 相对较高, 可能的原因是使用了大分子引发剂, 且大分子引发剂生色团的五元氮杂环同辛酸亚锡作用影响了开环反应的进程, 从而使得分子量分布变宽. 同时, 我们通过红外光谱进一步确认了 PEG-c-PCL 的制备. 在图 2 所示红外光谱中, 同引发剂 PEG-c 相比, PEG-c-PCL 在 2900 cm^{-1} 左右的峰裂分为 2 个峰, 主要归结于 PEG 重复结构单元的亚甲基和 PCL 重复结构单元的亚甲基峰. 此外, 聚合物在 1727 cm^{-1} 左右出现了明显的酯键特征峰, 进一步证明了聚合物 PEG-c-PCL 的成功制备.

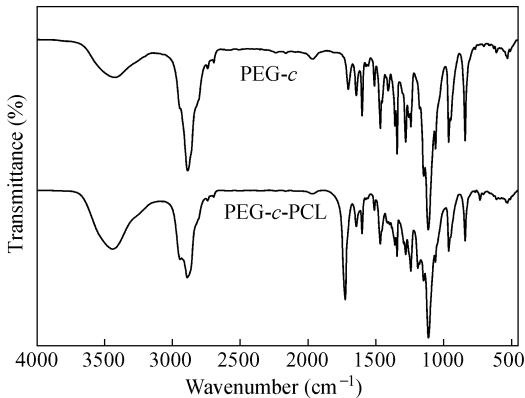


Fig. 2 FTIR spectra of PEG-c and PEG-c-PCL

2.2 紫外和荧光性能

取一定浓度的生色团和聚合物 PEG-c-PCL 的四氢呋喃溶液, 分别测定其紫外吸收和荧光发射光谱, 如图 3 所示. 从图中可以看出, 生色团和聚合物具有相似的紫外吸收光谱, 两者的最大吸收峰都在 371 nm , 这是因为单一聚合物链只有 1 个生色团的缘故. 从荧光发射光谱可知, 生色团最大发射峰在 427 nm . 但是, 同生色团荧光发射峰对比, 聚合物的荧光最大发射峰出现了 6 nm 的红移, 这可能是由于形成高分子后, 生色团两端的高分子链段在一定程度上增加了生色团的共平面性的结果.

绿色荧光蛋白本身是一个只含有单一生色团的生物大分子, 通过生物自组装限制了自身生色团的自由旋转, 从而获得优异的光学性能. 受这一原理启发, 我们设计并制备了含有单一生色团的

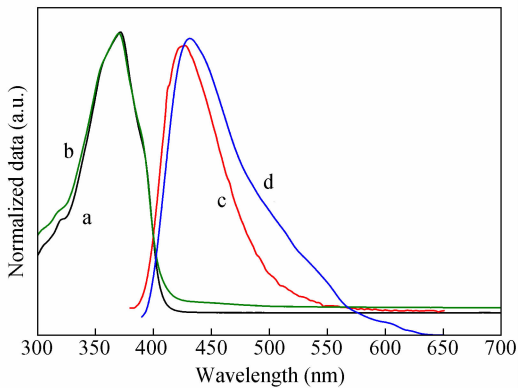


Fig. 3 UV-Vis spectra of the chromophore (a) and PEG-c-PCL (b), and fluorescence emission spectra of the chromophore (c) and PEG-c-PCL (d) in THF $\lambda_{\text{ex}} = 371\text{ nm}$; Slit width was 15/15 nm.

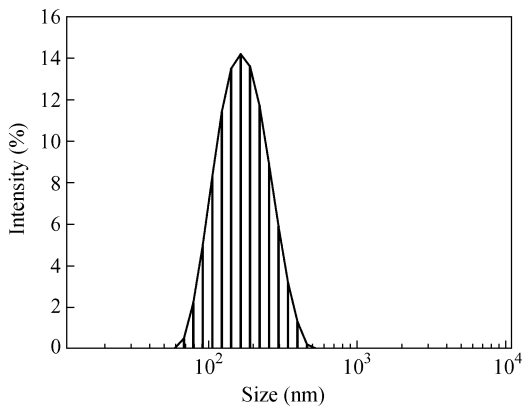


Fig. 4 The size distribution of PEG-c-PCL nanoparticles determined by DLS

两亲性嵌段聚合物 PEG-c-PCL. 由于具有两亲性, PEG-c-PCL 可以通过自组装形成纳米粒子. 图 4 给出了动态光散射的实验结果, 证明 PEG-c-PCL 通过自组装形成了粒径约 160 nm 的纳米粒子, 其粒径分布为 0.14. 同时, 图 5 中的透射电镜图片进一步确认了纳米粒子的粒径在 160 nm 左右, 且分布较窄. 利用荧光发射光谱研究了组装对于聚合物荧光性质的影响. 图 6 谱图 (a) 是 PEG-c-PCL 在四氢呋喃中的荧光发射谱图, 可以看出聚合物在完全溶解的状态下, 荧光强度非常弱. 当组装成为纳米颗粒, 图 6 (b) 荧光强度明显增强, 大约增大了 55 倍. 这是因为纳米颗粒的形成抑制了生色团的自由旋转, 从而大幅度提高了聚合物荧光性能. 与此同时, 聚合物组装体的荧光发射峰出现了大约 14 nm 的红移和不明显的肩峰. 这主要归结于两个方面: (1) 聚合物组装形成纳米粒子后, 生色团的共平面性增加, 产生红移现象; (2) 形成纳

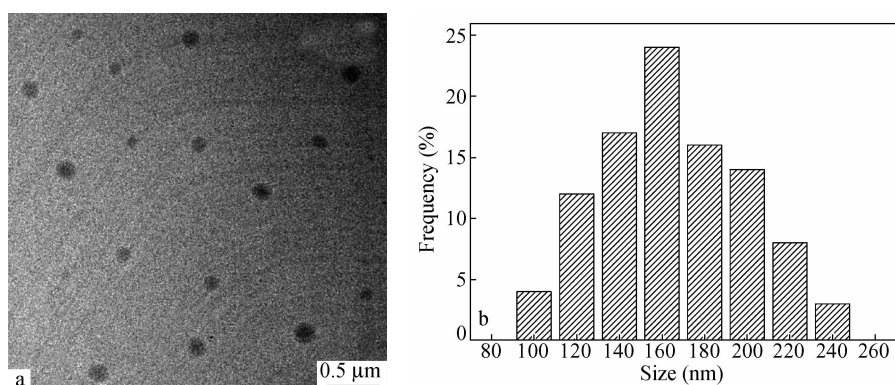


Fig. 5 (a) TEM and (b) the corresponding size distribution of PEG-c-PCL nanoparticles

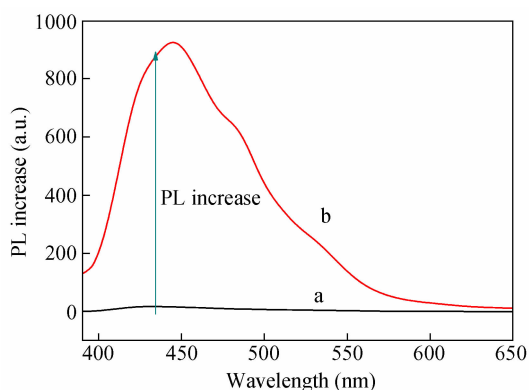


Fig. 6 Fluorescence emission spectra of PEG-c-PCL in THF (a) and after self-assembly (b) with a concentration of 0.4 mg/mL $\lambda_{\text{ex}} = 371 \text{ nm}$; Slit width was 10/10 nm.

米颗粒以后,聚合物和生色团的相互作用增强.通过模拟 GFP 发光原理,我们利用自组装方法增强了 PEG-c-PCL 的荧光性能.

2.3 细胞成像

GFP 被广泛应用于细胞生物学.为了探索这类新型荧光聚合物在细胞生物学中的应用,我们将其组装后形成的纳米粒子用于细胞成像.图 7 分别给出了聚合物纳米粒子和生色团培养的 MCF-7 细胞的荧光显微镜图片.从图中可以看出,聚合物纳米粒子可以进入 MCF-7 细胞,并且具有明显的荧光信号.相反,单独的生色团却没有任何的荧光信号.单独的生色团能够自由旋转,故而本身的荧光非常弱,不足以进行成像.两亲性聚合物 PEG-c-PCL 能够自组装形成纳米粒子,很大程度上限制了生色团的自由旋转,使得组装后形成的纳米粒子具有较强的荧光性能.此外,纳米粒子的粒径在 160 nm 左右,容易被细胞吞噬,显示了良好的细胞成像效果.总之,这类新型荧光聚合物能够被用于细胞成像,并有望进一步用于细胞生物学.

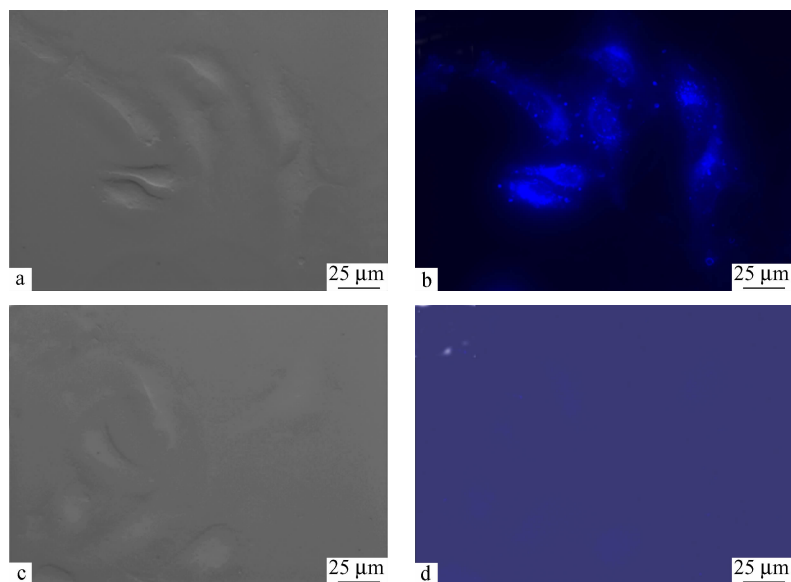


Fig. 7 Fluorescence microscopic images of MCF-7 cells incubated with PEG-c-PCL nanoparticles (a and b) and the chromophore (c and d) The cells were incubated for 6 h.

3 结论

受绿色荧光蛋白 (GFP) 发光原理启发, 本文以 GFP 生色团修饰的聚乙二醇为大分子引发剂, 通过开环聚合制备了两亲性荧光聚合物 PEG-c-PCL. 借助¹H-NMR, ¹³C-NMR, FTIR 和 GPC 等证明了其结构. 生色团和聚合物有类似的紫外吸收光谱, 最大吸收峰在 371 nm 左右. 与生色团荧光发射谱相比, 聚合物的最大发射峰出现了 6 nm 的

红移, 这可能是高分子化带来的结果. 透射电镜和动态光散射表明, 两亲性荧光聚合物 PEG-c-PCL 能够组装成 160 nm 的纳米粒子, 荧光强度增强了 55 倍, 且荧光发射峰出现了 14 nm 的红移, 这些现象归结于荧光生色团自由旋转的限制和组装导致的相互作用增强. 最后, 荧光增强的聚合物纳米粒子被成功地应用于细胞成像. 通过模仿自然, 我们设计并成功制备了一类新型的荧光聚合物, 这类荧光聚合物在成像领域具有良好的应用前景.

REFERENCES

1 Brejc K B, Sixma T K, Kitts P A, Kain S R, Tsien R Y, Ormö M, Remington S J. *Proc Natl Acad Sci*, 1997, 94: 2306 ~ 2311

2 Wall M A, Socolich M, Ranganathan R. *Nature Struct Biol*, 2000, 7: 1133 ~ 1138

3 Baird G S, Zacharias D A, Tsien R Y. *Proc Natl Acad Sci*, 2000, 97: 11984 ~ 11989

4 Labas Y A, Gurskaya N G, Yanushevich Y G, Fradkov A F, Lukyanov K A, Lukyanov S A, Matz M V. *Proc Natl Acad Sci*, 2002, 99: 4256 ~ 4261

5 Heim R, Prasher D C, Tsien R Y. *Proc Natl Acad Sci*, 1994, 91: 12501 ~ 12504

6 Philips G N. *Curr Opin Struct Biol*, 1997, 7: 821 ~ 827

7 Dong J, Solntsev K M, Tolbert L M. *J Am Chem Soc*, 2006, 128: 12038 ~ 12039

8 Niwa H, Inouye S, Hirano T, Matsuno T, Kojima S, Kubota M, Ohashi M, Tsuji F I. *Proc Natl Acad Sci*, 1996, 93: 13617 ~ 13622

9 Dong J, Solntsev K M, Poizat O, Tolbert L M. *J Am Chem Soc*, 2007, 129: 10084 ~ 10085

10 Tolbert L M, Baldrige A, Kowalik J, Solntsev K M. *Acc Chem Res*, 2011, 45: 171 ~ 181

11 Kojima S, Ohkawa H, Hirano T, Maki S, Niwa H, Ohashi M, Inouye S, Tsuji F I. *Tetra Lett*, 1998, 39: 5239 ~ 5242

12 He X, Bell A F, Tonge P J. *Org Lett*, 2002, 4: 1523 ~ 1526

13 Baldrige A, Solntsev K M, Song C, Tanioka T, Kowalik J, Hardcastle K, Tolbert L M. *Chem Commun*, 2010, 46: 5686 ~ 5688

14 Lee J S, Baldrige A, Feng S, SiQiang Y, Kim Y K, Tolbert L M, Chang Y T. *ACS Comb Sci*, 2011, 13: 32 ~ 38

15 Chen K Y, Cheng Y M, Lai C H, Hsu C C, Ho M L, Lee G H, Chou P T. *J Am Chem Soc*, 2007, 129: 4534 ~ 4535

16 Wu L X, Burgess K. *J Am Chem Soc*, 2008, 130: 4089 ~ 4096

17 Baldrige A, Samanta S R, Jayaraj N, Ramamurthy V, Tolbert L M. *J Am Chem Soc*, 2010, 132: 1498 ~ 1499

18 Deng H P, Zhu Qi, Wang D L, Tu C L, Zhu B S, Zhu X Y. *Polym Chem*, 2012, 3: 1975 ~ 1977

SYNTHESIS AND OPTICAL PROPERTIES OF GFP-MIMIC FLUORESCENT POLYMER

Hong-ping Deng^{1,2}, Qi Zhu², Da-li Wang², Bang-shang Zhu¹, Xin-yuan Zhu^{1,2}

(¹ Instrumental Analysis Center, ² School of Chemistry and Chemical Engineering, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240)

Abstract To mimic the fluorescence enhancement behavior of green fluorescent protein (GFP), an amphiphilic polymer, poly(ethylene glycol)-chromophore-poly(ϵ -caprolactone) (PEG-c-PCL), was successfully prepared by ring-opening polymerization using chromophore-endcapped PEG as the macroinitiator. ¹H- and ¹³C nuclear magnetic resonance (¹H and ¹³C-NMR), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), gel permeation chromatography (GPC) and ultraviolet-visible absorption (UV-Vis) were applied to study the structure and properties of PEG-c-PCL. Both the chromophore and PEG-c-PCL gave similar UV-Vis spectra with a maximum absorption peak at about 371 nm. From the emission spectra, the chromophore had an emission peak at about 427 nm, while PEG-c-PCL showed a 6 nm red-shift, attributable to the influence of polymerization. The amphiphilic PEG-c-PCL could self-assemble into nanoparticles with a diameter of about 160 nm, which was confirmed by transmission electron microscopy (TEM) and dynamic light scattering (DLS) measurements. Importantly, the emission intensity of PEG-c-PCL increased by about 55 times after self-assembly into nanoparticles, and the emission peak showed a 14 nm red-shift in the emission spectrum. These phenomena could be attributed to the chromophore's rotation restriction and the increased interactions after self-assembly. Finally, the self-assembled PEG-c-PCL nanoparticles were successfully used in cell imaging, illustrating the potential application of this new kind of fluorescent polymer.

Keywords Fluorescent polymer, Green fluorescent protein, Self-assembly, Imaging