

利用聚合物自组装实现绿色荧光蛋白生色团的荧光增强*

王国建 朱 琦 邓洪平 王大力 朱新远** 颜德岳**

(上海交通大学化学化工学院 上海 200240)

摘 要 根据绿色荧光蛋白的发光原理,采用聚乙二醇与聚甲基丙烯酸甲酯的两亲性两嵌段聚合物通过自组装包覆生色团的方式,模拟了绿色荧光蛋白发光,考察了组装行为对光学性能的影响,并将其用于细胞成像.通过核磁共振、高分辨质谱、傅里叶变换红外光谱、凝胶渗透色谱、紫外-可见吸收光谱及荧光光谱等表征了生色团分子和聚合物的结构及性能.生色团紫外最大吸收在 371 nm,荧光最大发射峰在 428 nm.聚合物和生色团进行组装后,其紫外吸收消失,而最大荧光发射峰强度大大增强,且发生了约 70 nm 的红移,这是因为组装使得生色团的自由旋转受到了限制,且生色团共平面性增加.动态光散射(DLS)和透射电镜(TEM)证明了纳米粒子的结构和尺寸.由于尺寸适合且具有较好的荧光性能,纳米粒子成功应用于细胞成像.这种绿色荧光蛋白生色团的简单自组装方式在生物成像领域具有良好应用前景.

关键词 绿色荧光蛋白, 荧光生色团, 两亲性嵌段聚合物, 自组装, 成像

绿色荧光蛋白(GFP)自发现以来就受到人们的极大关注,对其发光机理及应用的研究层出不穷,目前已经广泛应用于基因表达标记、蛋白质定位、生物传感器、分子生物学、生物探针和生物成像等领域^[1~11]. GFP 的荧光性能主要与内部的荧光生色团和外部 β 折叠形成的圆柱体有关.当 β 折叠通过分子内氢键形成筒状结构而 α 螺旋位于筒状结构两端时,内部生色团的自由旋转受到限制,导致 GFP 的荧光增强.相反,当这种结构解组装时, GFP 的荧光非常微弱^[12~16].

单纯的生色团并不能表现出 GFP 那样的荧光,如何模仿 GFP 的发光原理使合成的生色团再现优异荧光,是实现其实际应用的关键所在.总结之前研究成果可以看出,解决这一问题主要有四种方式:一是通过生色团中的原子限制自身自由旋转,如 Wu 等^[17]合成了一系列含硼的 GFP 生色团类似物,利用硼原子限制生色团自由旋转,大幅度提高了生色团类似物的荧光性能;其次是通过分子内氢键限制生色团的自由旋转,如 Chen 等^[18]合成了间位取代的 GFP 生色团类似物,通过分子内氢键限制自身旋转,提高了荧光性能;再次是利用与其他小分子或蛋白的主客相互作用限制生色团的自由旋转提升荧光性能,如 Baldridge

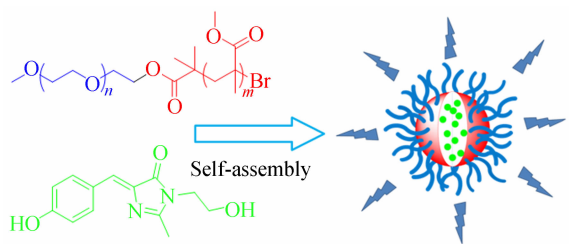
等^[19, 20]利用“八面体酸”分子形成的二聚体空腔;以及人体血清蛋白封装生色团的方式,提升了生色团的荧光性能, Sakamoto 等^[21]利用 β 环糊精和香豆素的主客作用限制生色团,提高了其荧光性能.最近, Deng 等^[22, 23]利用生色团制备聚乙二醇大分子引发剂,引发疏水性单体聚合,再利用两亲性聚合物的自组装提高了聚合物分子骨架中生色团的荧光性能.

从本质上讲, GFP 荧光增强是因为蛋白分子从低级结构形成圆柱体结构时内部生色团自由旋转受到限制,因此可以认为 GFP 通过分子自组装增强了自身的荧光性能.众所周知,两亲性嵌段聚合物可以自组装成形状和尺寸可控的纳米颗粒,通过简单封装就可以限制生色团的自由旋转.根据这一设想,我们分别设计合成了生色团和两亲性嵌段聚合物,通过聚合物组装包覆生色团,提高了生色团的荧光性能,并将其成功应用于细胞成像,如示意图 1 所示.上述仿生过程非常简单,可以根据需要选择生色团和聚合物的种类,并设计不同的组装结构,选择性和调控性非常高,具有良好的应用前景.

* 庆祝王佛松院士 80 华诞专稿;2012-12-21 收稿,2013-02-06 修稿;国家自然科学基金杰出青年基金(基金号 21025417)和科技部重大研究计划(项目号 2012CB821500,2013CB834506)资助项目.

** 通讯联系人, E-mail: xy Zhu@sjtu.edu.cn; dy Yan@sjtu.edu.cn

doi:10.3724/SP.J.1105.2013.12418



Scheme 1 Fluorescence enhancement of GFP chromophore through polymeric self-assembly

1 实验部分

1.1 试剂和仪器

1.1.1 试剂

甲苯、二氯甲烷和三乙胺,分析纯,中国医药集团上海试剂公司,氢化钙回流后使用;4-羟基苯甲醛,化学纯,中国医药集团上海试剂公司,直接使用;甲基丙烯酸甲酯,分析纯,氢化钙除水蒸馏提纯后使用;无水甲醇和无水乙醇,分析纯,中国医药集团上海试剂公司,镁粉回流后使用;无水碳酸钾,分析纯,中国医药集团上海试剂公司,直接使用;溴化亚铜,分析纯,阿拉丁公司,乙酸和乙醇处理后使用;聚乙二醇单甲醚($M_n = 2000$),西格玛奥德里奇公司,甲苯共沸除水后使用;2-溴-2-甲基丙酰溴(97%)、2-氨基乙醇(98%)、 N,N,N',N' -五甲基二亚乙基三胺(98%),阿尔法埃莎公司,直接使用;甘氨酸甲酯盐酸盐(99%)和乙基乙酰亚胺盐酸盐(97%),西格玛奥德里奇公司,直接使用;其他试剂均为分析纯,中国医药集团上海试剂公司,直接使用。

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),傅里叶变换红外光谱仪 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($MWCO = 1000$ g/mol,上海绿鸟科技公司),细胞培养用耗材(美国 Corning 公司),酶标仪 Elx800(美国 BioTek 公司),流式细胞仪 BD LSRFortessa(美国 BD 公司)和倒置荧光显微镜 DMI6000B(德国 Leica 公司)。

1.2 生色团分子的合成

GFP 生色团的合成由来已久,常用的方法主要有 3 种,分别是 Erlenmeyer 氮杂内酯法、Koevenagel 缩合法和 2,3-环加成法。其中 Erlenmeyer 氮杂内酯法是一种经典的制备 GFP 生色团及其衍生物的方法,而 2,3-环加成法则是近年来应用广泛的一种更直接高效的合成方法^[24~26]。在这里我们选择 2,3-环加成法合成了所需的生色团分子。

将 1.28 g 席夫碱与 1.23 g 亚氨酸酯于 10 mL 蒸馏过的无水甲醇中室温反应 24 h。除去甲醇后过层析柱,乙酸乙酯为淋洗剂,除去溶剂,干燥得 0.97 g 黄色固体。产率 51.0%。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, 298 K, δ): 10.08 (s, 1H, ArOH), 8.07 ~ 8.05 (d, 2H, Ar), 6.86 (s, 1H, CH), 6.83 ~ 6.80 (d, 2H, Ar), 4.94 (s, 1H, OH), 3.60 ~ 3.49 (m, 4H, CH_2CH_2), 2.34 (s, 3H, CH_3)。

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, 298 K, δ): 170.6, 163.2, 160.2, 136.8, 134.7, 126.0, 116.4, 59.5, 43.5, 16.3。

HRMS: m/z [$\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_3$] 计算值: 246.1004, [$\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_3$] $^+$ 实验值: 247.1083。

FTIR (KBr): 3152, 1707, 1641, 1599, 1514, 1450, 1414, 1365, 1284, 1171, 1143, 1065, 920, 833, 766, 600 和 487 cm^{-1} 。

1.3 聚乙二醇-*b*-聚甲基丙烯酸甲酯嵌段聚合物(PEG-*b*-PMMA)的制备

1.3.1 聚乙二醇大分子引发剂的制备

将 20 g 聚乙二醇单甲醚(PEG, $M_n = 2000$)溶于 100 mL 甲苯,于 $145\text{ }^\circ\text{C}$ 共沸除水,除去大部分剩余甲苯,加入 130 mL 除水的二氯甲烷以及 2.3 mL 除水的三乙胺,在冰浴下缓慢加入 2 mL 的 2-溴-2-甲基丙酰溴,缓慢升至室温,反应 24 h。然后分别用饱和碳酸钠溶液、饱和氯化钠溶液和清水洗涤,用无水硫酸钠干燥,浓缩,在冰乙醚里沉淀, $35\text{ }^\circ\text{C}$ 真空干燥,得到 19.2 g 白色固体。产率约 95%。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , 298 K, δ): 4.30 ~ 4.28 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCO}$), 3.80 ~ 3.42 (m, ca. 180H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.35 (s, 3H, OCH_3), 1.91 (s, 6H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$)。

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , 298 K, δ): 72.1, 70.7, 69.5, 68.9, 65.3, 59.2, 55.9,

30.9.

1.3.2 嵌段聚合物的制备

将聚乙二醇大分子引发剂、甲基丙烯酸甲酯和 N,N,N',N',N'' -五甲基二亚乙基三胺溶于回流过的甲苯中,用液氮冻融抽排气 3 次后加入溴化亚铜,再冻融抽排气 3 次,缓慢融化后加热至 80 °C 反应 2 ~ 3 h,液氮冷冻终止反应. 四氢呋喃稀释后,过中性氧化铝层析柱除去溴化亚铜. 浓缩后于冰甲醇中沉淀,35 °C 真空干燥后得到白色固体.

1.4 光学性质研究

取一定量的生色团四氢呋喃溶液及生色团和聚合物混合的四氢呋喃溶液,测定其紫外吸收和荧光发射光谱. 配制生色团浓度为 0.3 mg/mL、聚合物浓度为 5 mg/mL 的四氢呋喃溶液,按一定比例取溶液滴加到水中组装成纳米粒子,测其紫外吸收和荧光发射. 然后通过透析的方式除去四氢呋喃,再次测其紫外吸收和荧光发射. 取同一样品,改变组装过程中水和四氢呋喃的比例,研究其荧光的变化.

1.5 细胞毒性与流式细胞分析及细胞成像

选用一种常见的贴壁细胞-人乳腺癌 MCF-7 细胞进行细胞毒性评估、流式细胞分析以及细胞成像.

在细胞毒性测试中,首先将 MCF-7 细胞按照 8000 细胞/孔的密度接种到 96 孔培养板中培养 24 h,然后用细胞培养液配制聚合物/荧光生色团组装体的不同浓度的溶液,每孔中加入上述稀释液 250 μ L,继续孵育 24 h 之后每孔加入 20 μ L 的 5 mg/mL MTT PBS 溶液. 4 h 之后,用移液器小心地吸去培养孔中的液体,将得到的甲瓖溶于 200 μ L DMSO 中. 通过酶标仪测定每个培养孔在 490 nm 处的紫外吸收强度,确定不同浓度样品处理后的细胞存活比例.

在流式分析中,先将 MCF-7 细胞按照 450000/孔的密度接种在 6 孔板培养 24 h,然后加入细胞培养液稀释后的组装体,最终培养孔中样品的浓度约为 0.25 mg/mL. 样品与细胞分别孵育 30 min,1 h,3 h 后,用 PBS 洗涤细胞,用 30 μ L 的胰酶对细胞进行消化,然后在 BD 公司流式细胞计数仪上对细胞进行分析.

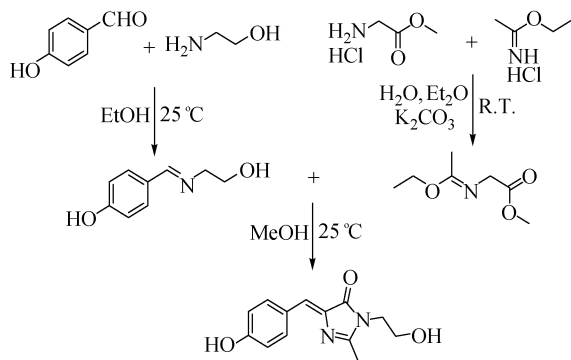
在细胞成像实验中,先将 MCF-7 细胞按照 10000/孔的密度接种在放置有细胞玻璃爬片的 24 孔板培养 24 h,然后加入浓度为 0.5 mg/mL 的

组装体溶液,孵育 3 h 后,将细胞用 PBS 洗涤,多聚甲醛溶液固定之后进行封片,在 Leica DMI6000B 倒置荧光显微镜下进行观察.

2 结果与讨论

2.1 生色团分子的制备与表征

采用 2,3-环加成的方法合成了生色团分子,如示意图 2 所示. 在生色团的氢谱中, $\delta = 8.07 \sim 8.05$ 和 6.83 ~ 6.80 为苯环的特征峰, $\delta = 10.08$ 和 4.94 分别对应酚羟基和醇羟基, $\delta = 6.86$ 则对应 $C=CH$ 处的氢原子. 生色团分子的计算分子量为 $[C_{13}H_{14}N_2O_3]^+$: 246.1004, 其高分辨质谱的正离子峰为 $[C_{13}H_{15}N_2O_3]^+$: 247.1083, 与计算值吻合. 在红外光谱中,3152 cm^{-1} 对应醇羟基和酚羟基的伸缩振动,1707 cm^{-1} 对应 $C=O$ 的伸缩振动,1641 cm^{-1} 对应 $C=N$ 的伸缩振动,1599 cm^{-1} 对应 $C=C$ 的伸缩振动,1514 cm^{-1} 对应苯环的骨架振动. 核磁、质谱和红外光谱实验结果表明,我们得到了 GFP 生色团分子.

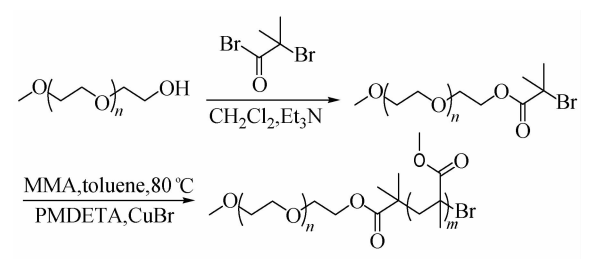


Scheme 2 Synthesis of GFP chromophore

2.2 PEG-*b*-PMMA 的制备和表征

首先利用聚乙二醇单甲醚 (PEG) 和 2-溴-2-甲基丙酰溴反应合成原子转移自由基聚合的大分子引发剂,然后在 N,N,N',N',N'' -五甲基二亚乙基三胺和溴化亚铜的作用下,以甲苯为溶剂,利用大分子引发剂引发甲基丙烯酸甲酯的原子转移自由基聚合,制备两亲性嵌段聚合物 PEG-*b*-PMMA, 如示意图 3 所示.

根据实验需要,我们用同一大分子引发剂合成了 4 种不同分子量的两嵌段聚合物. 在嵌段聚合物的红外光谱结构中,1142 cm^{-1} 吸收峰来源于 PEG 的 $C-O-C$ 伸缩振动,而 1730 和 2952 cm^{-1} 吸收峰则对应于 PMMA 中羰基特征峰和甲基的非对称伸缩振动. 此外,从核磁氢谱中可以看出,



Scheme 3 Preparation of PEG-*b*-PMMA

PEG 的特征峰分别位于 $\delta = 3.35$ 和 3.61 , 而 PMMA 的特征峰位于 $\delta = 0.82, 0.99, 1.79$ 和 3.57 . 相应的碳谱也进一步证明我们已合成了 PEG-*b*-PMMA 两嵌段聚合物. 通过氢谱积分算出样品 A 的分子量 (M_n) 约为 1.0×10^4 , 与 GPC 结果 0.9×10^4 相吻合. 另外 3 个样品的核磁计算分子量和 GPC 结果如表 1 所示, 其 GPC 图谱如图 1 所示. 红外、核磁和 GPC 结果证明, 我们已合成了嵌段聚合物.

Table 1 Molecular weight of PEG-*b*-PMMA measured by NMR (M_n^*) and GPC

	A	B	C	D
$M_n^* \times 10^{-4}$	1.0	1.1	1.3	2.6
$M_n \times 10^{-4}$	0.9	1.5	1.8	2.1
$M_w \times 10^{-4}$	1.3	1.7	2.4	2.7
M_w/M_n	1.46	1.18	1.31	1.28

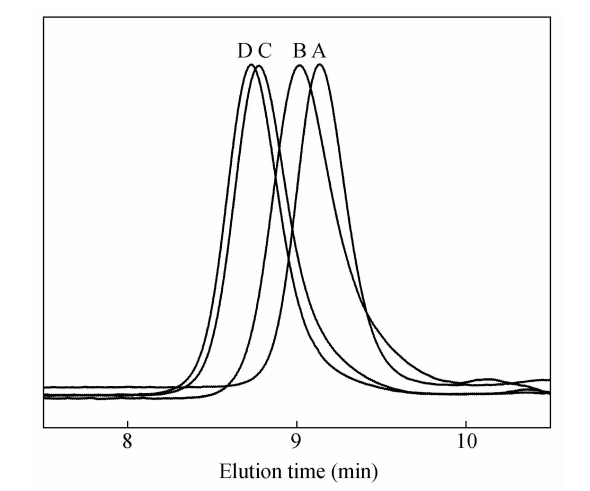


Fig. 1 Gel permeation chromatography (GPC) curves of PEG-*b*-PMMA

2.3 紫外和荧光性能

分别取生色团的四氢呋喃溶液、生色团和聚合物的四氢呋喃溶液, 测其紫外吸收和荧光发射. 两者紫外吸收位置均在 371 nm (如图 2 (a), 2(b)所示). 值得注意的是, 加入聚合物后生色团

的紫外吸收在 450 nm 左右呈现出肩峰. 生色团的最大发射峰在 428 nm , 加入聚合物后最大发射峰红移了约 8 nm (如图 2 (c), 2 (d) 所示). 紫外吸收的变化与荧光发射的红移可能是因为大量聚合物的存在 (生色团 0.3 mg/mL , 聚合物 5 mg/mL) 使得部分生色团发生堆积. 需要指出的是, 由于两种溶液中生色团都可以自由旋转, 因而荧光非常微弱.

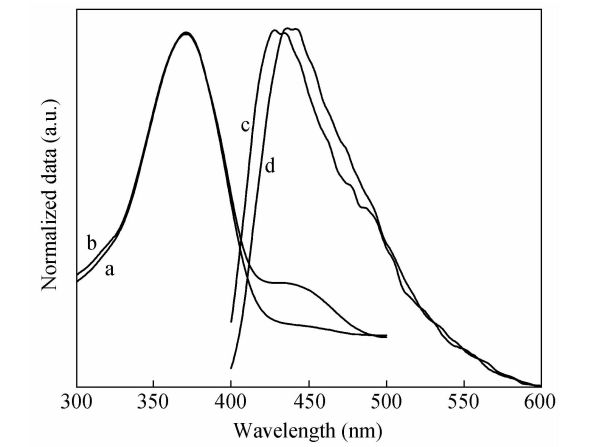


Fig. 2 UV-Vis spectra of the chromophore (a) and chromophore/polymer (b), and fluorescence emission spectra of the chromophore (c) and chromophore/polymer (d) in THF
 $\lambda_{\text{ex}} = 371\text{ nm}$

随后, 我们根据绿色荧光蛋白的发光机理, 将生色团与不同分子量的 PEG-*b*-PMMA 自组装形成纳米粒子, 并探索其光学性能. 表 2 和图 3 给出了动态光散射的测试结果, 从 A 到 D 聚合物的疏水链段逐渐增长, 分子量随之增大, 组装形成的纳米颗粒尺寸也逐渐增大. 图 4 是纳米粒子的 TEM 图片, 从图中可以看出纳米粒子的尺寸比较均一, 和动态光散射得到的 PDI 比较一致.

Table 2 DLS data of PEG- <i>b</i> -PMMA nanoparticles				
	A	B	C	D
$d\text{ (nm)}$	85.8	95.3	146.4	173.2
PDI	0.162	0.172	0.122	0.096

图 5 中谱线 (a) 为生色团溶解于四氢呋喃溶液的荧光发射谱图, A、B、C、D 为聚合物和生色团组装透析后的荧光发射谱图. 从图中可以看出, 单纯的生色团荧光强度非常低, 几乎可以忽略. 通过组装包覆后生色团荧光显著增强, 从样品 A 到 D 分别增强到原来的 42, 45, 68 和 76 倍, 且出现了较大的红移和肩峰, 这是因为生色团被纳米粒子

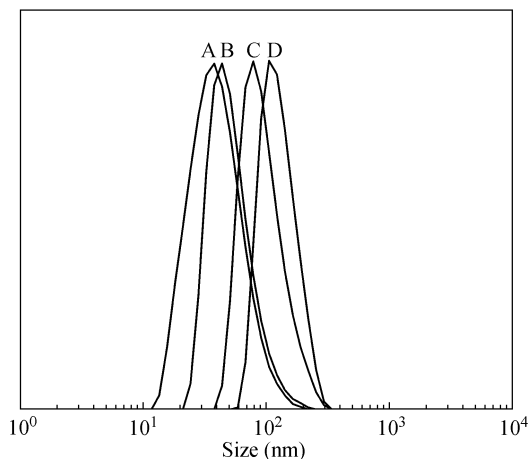


Fig. 3 The size distribution of PEG-*b*-PMMA nanoparticles determined by DLS

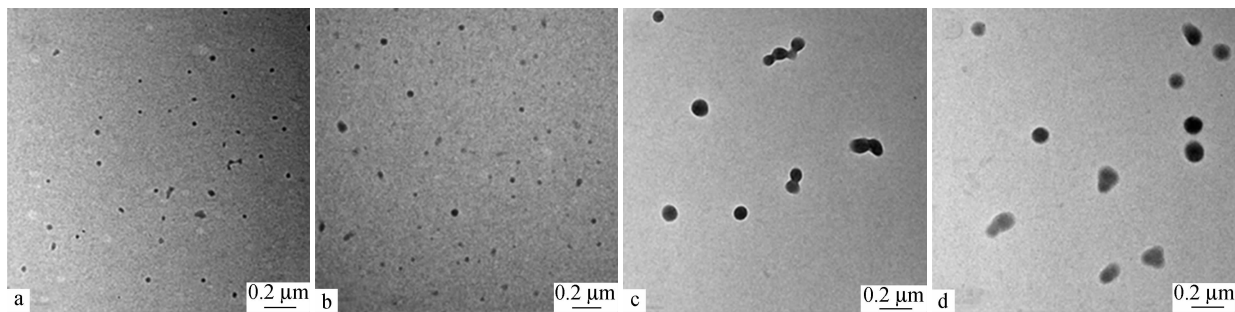


Fig. 4 TEM images of the PEG-*b*-PMMA nanoparticles

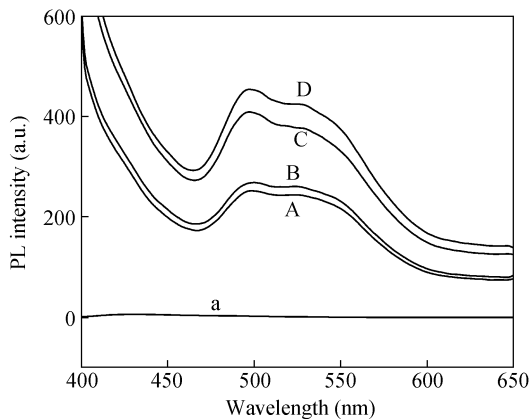


Fig. 5 Fluorescence emission spectra of chromophore in THF (a) and chromophore encapsulated in PEG-*b*-PMMA nanoparticles

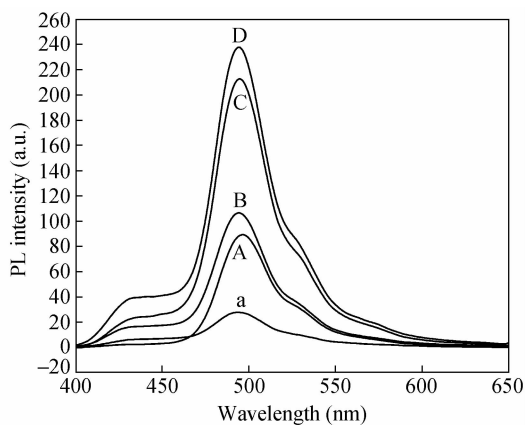


Fig. 6 Fluorescence emission spectra of chromophore in THF (a) and chromophore encapsulated in PEG-*b*-PMMA nanoparticles without any further treatment

2.4 细胞毒性、流式细胞分析及细胞成像

考虑到生色团和 PEG-*b*-PMMA 的组装体具有较好的荧光性能,参照 GFP 在细胞生物学方面的应用,我们对其进行了细胞成像研究。

首先,通过 MTT 方法评价了聚合物的细胞毒性,如图 8 所示. 经过 24 h 孵育,即使在 670 $\mu\text{g}/$

包覆后自由旋转被抑制,其共平面性增加且与聚合物的相互作用增强. 随着 PMMA 链段的增加,纳米颗粒疏水性增强,荧光增强效应更为明显。

为了研究纳米粒子形成过程对生色团荧光的影响,我们还测试了组装后未经任何处理的溶液的荧光性能. 从图 6 中可以看出,由于有机溶剂的存在,纳米粒子的致密性较低,因此荧光强度比图 5 相对较弱一些. 另外,我们用不同比例的水和四氢呋喃,配制了一系列生色团和 PEG-*b*-PMMA 的组装液,并测试其荧光,如图 7 所示. 随着有机溶剂的比例降低,纳米粒子越致密,生色团荧光越强。

mL 浓度下 MCF-7 细胞还有约 80% 的存活率,说明 PEG-*b*-PMMA 具有较低的细胞毒性,因此可以用于细胞成像。

然后,对生色团和纳米粒子分别进行了细胞流式分析,如图 9 所示. 左右两列分别是生色团和纳米颗粒被 MCF-7 细胞吞噬 0.5, 1, 3 h 后细胞所

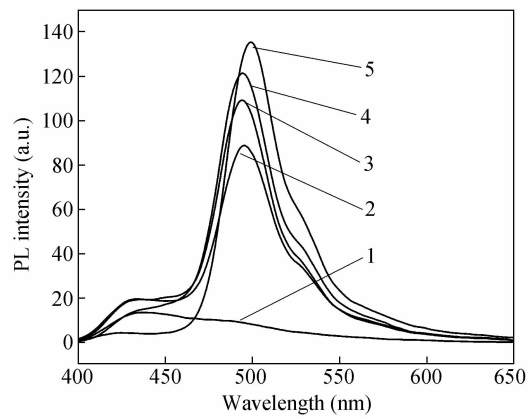


Fig. 7 Fluorescence emission spectra of self-assembly solution with different volume ratio of $\text{H}_2\text{O}/\text{THF}$ (from 1 to 5: 30/70, 50/50, 70/30, 83/17, 95/5)

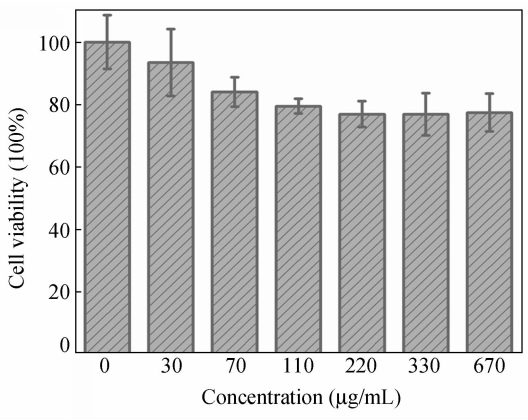


Fig. 8 Cell viability of MCF-7 cells against PEG-*b*-PMMA after cultured with different concentrations (mean $\pm$ S. D. , $n = 5$)

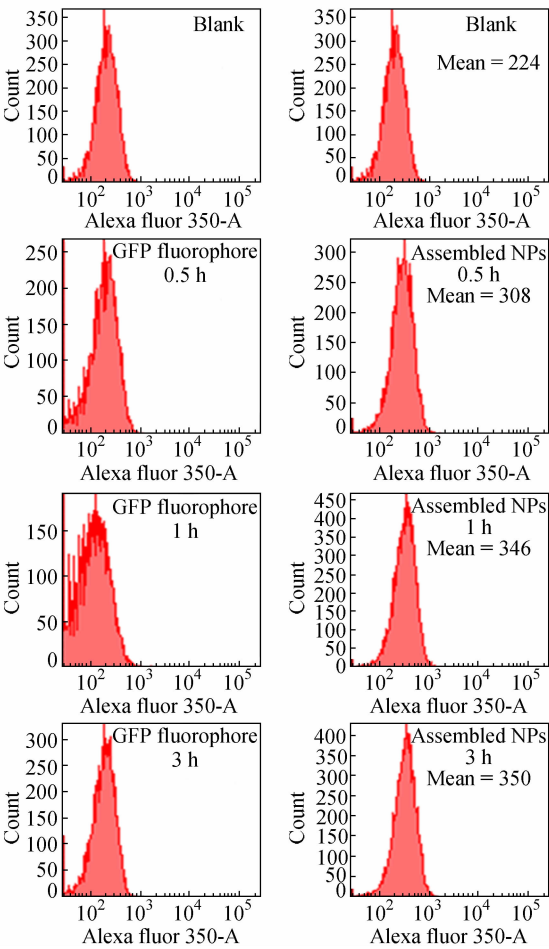


Fig. 9 Flow cytometry histogram profiles of the chromophore (left) and nanoparticles (right)

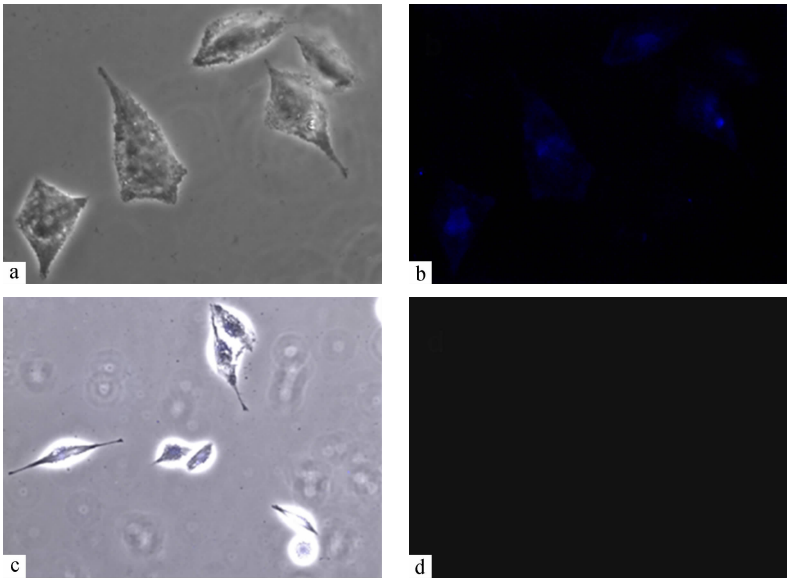


Fig. 10 Fluorescence microscopic images of MCF-7 cells incubated with PEG-*b*-PMMA/chromophore nanoparticles (a, b) and chromophore (c, d)

呈现出的荧光. 细胞吞噬生色团后一直到 3 h 并没有表现明显的荧光增强, 而细胞吞噬纳米粒子后其荧光强度随着时间增加而逐渐增强.

图 10 分别给出了组装体纳米粒子和生色团的 MCF-7 细胞荧光显微镜图片. 从图中可以看出, 组装体纳米粒子进入细胞后具有明显的荧光信号, 而对照组的生色团则没有相应的荧光信号. 单独的生色团能够自由旋转, 因而荧光非常弱, 无法满足荧光成像的要求. 一旦生色团分子被封装在两亲性 PEG-*b*-PMMA 纳米粒子中, 生色团的自由旋转受到极大限制, 所形成的纳米粒子具有较强的荧光性能, 可以成功用于细胞成像.

3 结论

根据绿色荧光蛋白的发光原理, 本文通过生色团和两亲性嵌段聚合物进行自组装, 成功模拟了 GFP 生色团的发光, 并将其应用于细胞成像. 红外、核磁、质谱、GPC 等证实了合成产物的结构, 光学性能的表征证明了对绿色荧光蛋白发光的成功模拟, 而细胞成像则验证了其应用. 由于两亲性聚合物合成的可设计性、分子量和链段的可调控性、组装体制备的简便性, 使得通过聚合物自组装包覆生色团进行成像有良好的应用前景.

REFERENCES

- 1 Prasher D, McCann R O, Cormier M J. *Biochem Biophys Res Commun*, 1985, 126: 1259 ~ 1268
- 2 Cubitt A B, Heim R, Adams S R, Boyd A E, Gross L A, Tsien R Y. *Trends Biochem Sci*, 1995, 20: 448 ~ 455
- 3 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
- 4 Tsien R Y. *Annu Rev Biochem*, 1998, 67: 509 ~ 544
- 5 Wall M A, Socolich M, Ranganathan R. *Nature Struct Biol*, 2000, 7: 1133 ~ 1138
- 6 Baird G S, Zacharias D A, Tsien R Y. *Proc Natl Acad Sci*, 2000, 97: 11984 ~ 11989
- 7 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
- 8 Zimmer M. *Chem Rev*, 2002, 102: 759 ~ 781
- 9 Miyawaki A. *Develop Cell*, 2003, 4: 295 ~ 305
- 10 Meech S R. *Chem Soc Rev*, 2009, 38: 2922 ~ 2934
- 11 Craggs T D. *Chem Soc Rev*, 2009, 38: 2865 ~ 2875
- 12 Heim R, Prasher D C, Tsien R Y. *Proc Natl Acad Sci*, 1994, 91: 12501 ~ 12504
- 13 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
- 14 Dong J, Solntsev K M, Tolbert L M. *J Am Chem Soc*, 2006, 128: 12038 ~ 12039
- 15 Dong J, Solntsev K M, Poizat O, Tolbert L M. *J Am Chem Soc*, 2007, 129: 10084 ~ 10085
- 16 Sakamoto S, Kudo K. *J Am Chem Soc*, 2008, 130: 4089 ~ 4096
- 17 Wu L X, Burgess K. *J Am Chem Soc*, 2008, 130: 4089 ~ 4096
- 18 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
- 19 Baldrige A, Samanta S R, Jayaraj N, Ramamurthy V, Tolbert L M. *J Am Chem Soc*, 2010, 132: 1498 ~ 1499
- 20 Baldrige A, Feng S, Chang Y T, Tolbert L M. *ACS Comb Sci*, 2011, 13: 214 ~ 217
- 21 Sakamoto S, Kudo K. *J Am Chem Soc*, 2008, 130: 9574 ~ 9582
- 22 Deng H P, Zhu Qi, Wang D L, Tu C L, Zhu B S, Zhu X Y. *Polym Chem*, 2012, 3: 1975 ~ 1977
- 23 Deng Hongping(邓洪平), Zhu Qi(朱琦), Wang Dali(王大力), Zhu Bangshang(朱邦尚), Zhu Xinyuan(朱新远). *Acta Polymerica Sinica* (高分子学报), 2012, (10): 91 ~ 97
- 24 Tolbert L M, Baldrige A, Kowalik J, Solntsev K M. *Acc Chem Res*, 2012, 2: 171 ~ 181
- 25 Baldrige A, Solntsev K M, Song C, Tanioka T, Kowalik J, Harcastle K, Tolbert L M. *Chem Commun*, 2010, 46: 5686 ~ 5688
- 26 Baldrige A, Kowalik J, Tolbert L M. *Synthesis*, 2010, 14: 2424 ~ 2436

FLUORESCENCE ENHANCEMENT OF GFP CHROMOPHORE
THROUGH POLYMERIC SELF-ASSEMBLY

Guo-jian Wang, Qi Zhu, Hong-ping Deng, Da-li Wang, Xin-yuan Zhu, De-yue Yan
(School of Chemistry and Chemical Engineering, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240)

Abstract The fluorescence enhancement of green fluorescence protein (GFP) chromophore was realized through the self-assembly of amphiphilic block polymer and GFP chromophore. GFP chromophore and a series of amphiphilic poly (ethylene glycol)-*b*-poly (methyl methacrylate) (PEG-*b*-PMMA) with different PMMA lengths were synthesized. ¹H and ¹³C nuclear magnetic resonance (¹H and ¹³C-NMR), high-resolution mass spectroscopy (HRMS), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), gel permeation chromatography (GPC), ultraviolet-visible absorption (UV-Vis) and fluorescent spectroscopy were applied to study the structure and properties of chromophore and polymers. The maximum UV-Vis absorption peak and fluorescent emission peak were at about 371 nm and 428 nm, respectively. After the self-assembly of PEG-*b*-PMMA with chromophore, the UV-Vis absorption of chromophore disappeared while the fluorescent emission intensity increased markedly with a red-shift of 70 nm, which could be attributed to the chromophore's rotation restriction in polymeric nanoparticles. The size and shape of nanoparticles were measured by dynamic light scattering (DLS) and transmission electron microscopy (TEM). Benefiting from the appropriate size and good fluorescent property, these PEG-*b*-PMMA/chromophore nanoparticles were used in cell imaging successfully.

Keywords Green fluorescent protein, Chromophore, Amphiphilic polymer, Self-assembly, Imaging