

原子转移自由基聚合在生物传感中的应用

李颖 吴亚锋 袁亮 刘松琴*

(东南大学化学化工学院, 南京 211189)

摘 要 原子转移自由基聚合(ATRP)是一种新颖的信号放大方法。在聚合过程中,成百上千个单体分子聚集形成长链聚合物,聚合物的侧链可以修饰丰富的功能基团,可与电化学或光学活性物质发生键合反应,从而显著增加单元生物分子识别反应信号分子的负载量,提高了检测灵敏度,实现了生物分子检测的信号放大。本文综述了 ATRP 的反应机理及其近年来在生物传感中的应用,并展望了其发展前景。

关键词 原子转移自由基聚合; 信号放大; 生物传感; 脱氧核糖核酸(DNA); 蛋白质; 评述

1 引言

对复杂生物样品中与疾病相关的生物分子进行灵敏、快速、准确检测,对于研究疾病的发生发展、诊断与治疗等具有十分重要的意义。但由于在疾病的发生发展初期,相关生物分子在组织或血液中表达很低,利用常规方法无法检测,难以实现疾病的早期诊断。因此,发展生物分析新原理新方法,实现生物检测的信号放大,有效提高检测灵敏度,是目前生物分析化学领域的热门课题。基于原子转移自由基聚合反应(ATRP)的信号放大是一个利用大分子的动态增长过程,即通过高分子聚合反应将信号标记的单体小分子连接在一起,形成一个含有几千个重复单元的高分子链,从而通过链增长将单个生物分子的识别过程放大成百上千倍,实现高效生物检测信号的放大。ATRP 反应条件温和,对生物大分子的官能团有良好的适应性,已经成为合成含有嵌段聚合物的生物大分子的最理想选择^[1-3]。近年来,基于 ATRP 的信号放大方法在 DNA 和蛋白质检测方面取得了显著进展,在生物传感中得到了广泛应用^[6-10]。

2 ATRP 的反应机理

ATRP 取决于少量增长基($P_n^{\cdot}$)和大量休眠种(P_nX)之间的动力学可逆平衡(图 1)^[11-13]。过渡金属复合物 $M_L^m(L)_z$ 通过氧化还原过程,从有机卤化物“提取”卤原子,产生氧化物种 $XM_L^{m+1}(L)_z$ 和自由基 $P_n^{\cdot}$;自由基 $P_n^{\cdot}$ 和烯烃 M 反应,生成自由基 $P-M^{\cdot}$ 。 $P-M^{\cdot}$ 与 $XM_L^{m+1}(L)_z$ 反应,得到目标产物 $P-M-X$,同时过渡金属还原为 $M_L^m(L)_z$,可以再次引发新一轮的反应。这个由 $M_L^m(L)_z/M_L^{m+1}(L)_z$ 催化的氧化还原过程,能使体系有效地保持一个很低的自由基浓度,从而使自由基的终止反应大大减低。聚合物卤化物 $P-M_n-X$ 可与 $M_L^m(L)_z$ 进行原子转移反应,生成具有引发活性的自由基 $P-M_n^{\cdot}$, $P-M_n^{\cdot}$ 进行链增长反应,生成新的自由基 $P-M_n^{m+1}$,再和 $XM_L^{m+1}(L)_z$ 反应生成相应的卤化物。在 ATRP 反应过程中,所有分子链在反应初期被引发,只要在合适的反应条件下,被引发的分子链在整个反应过程中都将保持活性。因为 ATRP 可控的/活性的性质,可以合成各种组织和结构的聚合物,如均聚物^[14-16]、梯度聚合物^[17,18]、接枝共聚物^[19-21]、嵌段聚合物^[22-24]、星状聚合物^[25-28]和超支化聚合物^[29-31]。ATRP 形成的聚合物材料作为载体可以增加信号分子的负载量,功能化的聚合物链的长度可以控制,探针的空间分布也可以调节。因此,ATRP 能用于构建基于聚合物的信号放大方法^[32-36],从而用于生物传感。

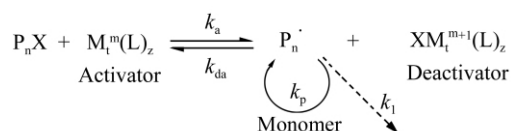


图 1 ATRP 的反应机理

Fig. 1 Mechanism of atom transfer radical polymerization (ATRP)

2012-05-23 收稿; 2012-09-26 接受

本文系国家自然科学基金资助项目(No. 20875013)

* E-mail: liusq@seu.edu.cn

3 ATRP 用于 DNA 的检测

在大多数情况下,长链聚合物材料可化学修饰大量功能基团,用作载体可以提供足够的活性位点,这些活性位点可用于捕获探针的结合,从而显著提高信号。Chen 等^[67]设计并合成了一种温敏聚合物聚氮-异丙基丙烯酰胺,通过改变温度实现温敏聚合物对 DNA 分子的吸附能力的改变,进而实现对 DNA 分子的选择性检测。应用本方法可以从生物样品中提取人类染色体 DNA 分子,对 hgDNA584 的检出限可以达到 2 mg/L,从而实现对 DNA 分子的快速检测。

Lou 等首次研究了 DNA 分子存在时表面引发的 ATRP 的反应机理^[68]。如图 2 所示,采用 ATRP 过程进行 DNA 检测包括两个独立的步骤:(a) DNA 的杂交;(b) 通过聚合过程产生信号放大。研究表明, DNA 分子可以作为生物催化剂,加速聚合物增长效率。这种聚合物辅助的传感信号放大传感策略可应用于 DNA 检测。所形成的聚合物层改变了表面的反射率和不透明度,聚合物“斑点”能直接用肉眼观察到,不需要精密的仪器即可定性识别特定的 DNA 序列,为便携式生物传感应用提供了很好的解决方法。

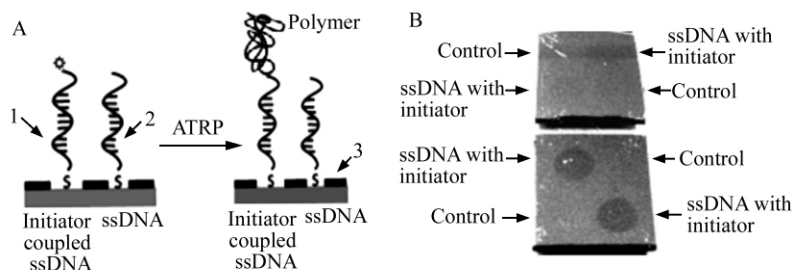


图 2 (A) DNA 增速的 ATRP 聚合物增长示意图^[68]

Fig. 2 (A) Surface chemistry used in the study of DNA-accelerated polymer growth^[68]

现制的标记有引发剂的 ssDNA (1) 固定在两块金基质表面,然后均浸于 MCH (3) 溶液中封闭金基质表面多余的活性位点以及除去非特异性吸附的 DNA 分子,然后引发表面 ATRP 反应。没有标记引发剂的 ssDNA (2) 作为控制实验。(B) 上图是 CuBr 与 bpy 的比例是 1:1.2, CuBr 为 69 mmol/L 时, ssDNA 分子上形成 PHEMA 后的图片,下图是 CuCl, CuBr₂, bpy 的比例是 1:0.3:2.9, CuCl 为 23 mmol/L 时, ssDNA 分子上形成 PHEMA 后的图片

Freshly reduced initiator-coupled ssDNA (1) was immobilized on the gold substrate first, the surface was then immersed in 6-mercapto-1-hexanol (MCH) (3) solution to block any unoccupied Au surface and to remove non-specifically adsorbed DNA molecules. After that, surface initiated ATRP was performed. The same ssDNA (2) without initiators was used as control. (B) Photograph showing two substrates in which poly(2-hydroxyethyl methacrylate) (PHEMA) was formed atop ssDNA molecules using (top) CuBr/bpy = 1:1.2 and [CuBr] = 69 mmol/L and (bottom) CuCl/CuBr₂/bpy = 1:0.3:2.9, and [CuCl] = 23 mmol/L.

在 DNA 分子催化加速聚合反应时,聚合只发生在 DNA 杂交后的特定位点。基于此,Zheng 等又研究了一种新型反相比色法^[69](图 3)。该方法有以下优势:(1) 传统的比色法需要移除大量的信号粒子来降低信号,而反相比色法可以直接测量留在溶液中的粒子;(2) 形成的聚合物具有空间稳定作用,降低了环境条件变化对金纳米粒子的影响;(3) 即使在苛刻的聚合条件下,金纳米粒子也不会发生团聚,这是由于聚合物的空间位阻效应使得金纳米粒子之间不会接触,从而消除了假阴性数值。电化学传感器具有高的选择性和灵敏度,更重要的是便于携带。因此,具有重要的实际应用价值。本课题组最近将 ATRP 技术和电化学方法相结合,制备出一种新型的 DNA 传感器^[69],单链 DNA 的检出限是 4 mg/L,双链 DNA 的检出限是 30 amol,进一步提高了传感器灵敏度,还提供了一个与现有商业传感技术兼容的平台。

4 ATRP 用于蛋白质的检测

ATRP 已经被成功用于定量检测特定的 DNA 序列,与那些传统的基于聚合酶链式反应的 DNA 检测方法相比,ATRP 具有好的重复性,更简单的分析程序和更快的分析周期。然而,ATRP 在蛋白质检测方面的应用还处于初级阶段。本课题组将 ATRP 反应辅助的信号放大方法与多种检测方法相结合,成功构建了多种生物传感器,可用于不同蛋白质的检测(图 4)。首先,选用电化学活性物质氨基二茂铁

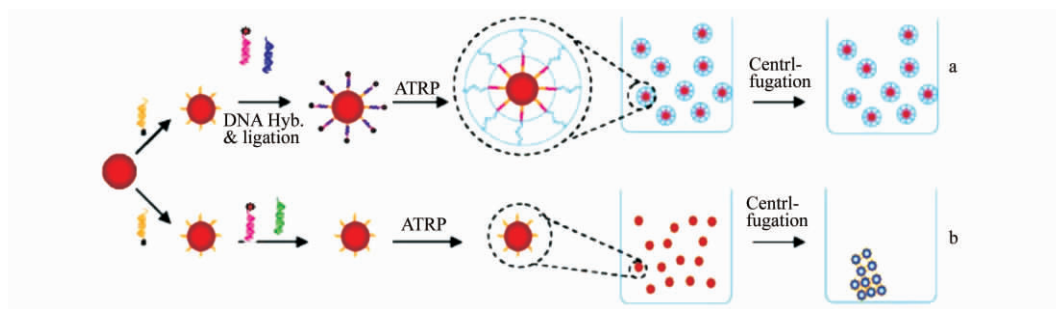


图 3 (a) 聚合物辅助反相比色法用于 DNA 的分析。通过杂交将聚合物引发剂固定到金纳米粒子表面,然后引发可控的自由基聚合反应,溶液呈现深紫红色; (b) 是控制实验,加入了不匹配的探针,金纳米粒子表面没有接有引发剂,故自由基聚合反应没有发生,溶液的颜色是蓝色的,底部可以清楚地看到有黑色的沉淀^[6]

Fig. 3 Polymer-assisted reverse colorimetric particle-based DNA assays. Polymer initiators were immobilized on the gold nanoparticle surface by hybridization that can trigger radical polymerization reactions. The particle solution was in burgundy (a) when DNA hybridization occurred, whereas the control solution turned into blue with black precipitates clearly observable at the bottom (b)^[6]

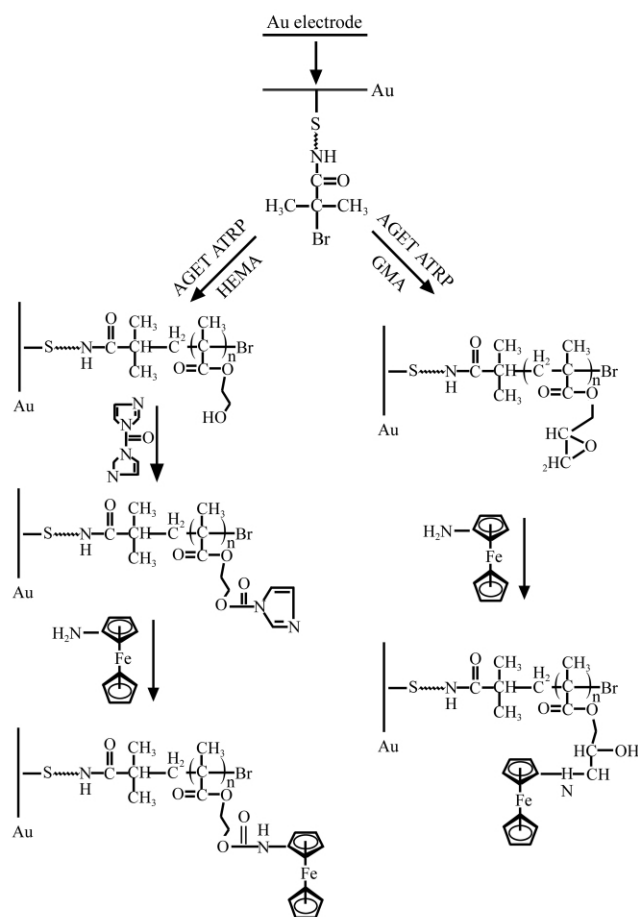


图 4 聚合物辅助的信号放大方法用于 DNA 和蛋白质检测的示意图^[6]

Fig. 4 Scheme of polymerization-assisted signal amplification strategies for DNA and protein detection^[6]

(FcNH_2) 作为信号分子。利用分子特异性识别将标记有引发基团的 Ovalbumin 固定到修饰有刀豆蛋白 A (Con A) 的电极或金片表面,选择具有活性环氧基的甲基丙烯酸缩水甘油酯 (GMA) 单体进行 ATRP 反应。椭圆偏振计数据表明,金片上形成的聚合物的厚度约为 20 nm。形成的长链聚合物侧链带有环氧基,能与 FcNH_2 发生键合反应,键合在聚合物链上的二茂铁衍生物具有灵敏的电化学响应,可用于溶液中 Ovalbumin 的测定。在最优实验条件下,Ovalbumin 浓度在 0.1 ~ 500 $\mu\text{g/L}$ 范围内,其浓度对数与电化学信号呈良好的线性关系,所得信号较传统的用 FcNH_2 标记的 Ovalbumin 作为信号分子的检测信号

放大了 9 倍^[4]。还利用夹心免疫反应将标记有引发基团的 PSA 或 CEA 固定到电极或金片表面,以 GMA 为单体进行 ATRP 反应。通过形成的长链聚合物侧链上环氧基嫁接 FcNH_2 , 制得灵敏的 PSA/CEA 电化学传感器。在最优实验条件下, PSA 和 CEA 浓度分别在 $0.001 \sim 40 \mu\text{g/L}$ 及 $0.0005 \sim 40 \mu\text{g/L}$ 范围内,其浓度对数与电化学信号呈良好的线性关系,检出限分别为 0.14 和 0.10 ng/L 。制得的传感器分别对 60 个 PSA 和 40 个 CEA 临床血样进行了检测,所得结果与临床电致化学发光方法得到的结果一致^[4]。

其次,选用具有电化学和化学发光活性的辣根过氧化物酶(HRP) 作为信号分子。利用夹心免疫反应将标记有引发基团的 PSA 固定到电极或金片表面,以 GMA 为单体进行 ATRP 反应。利用长链聚合物侧链上丰富的环氧基团与 HRP 分子中的活性氨基之间的化学反应,将 HRP 偶联在聚合物表面,制得 PSA 免疫传感器。在最优条件下, PSA 浓度在 $0.0005 \sim 20 \mu\text{g/L}$ 范围内,分别与电化学信号及流动注射化学发光信号呈良好的线性关系,检出限分别为 1.3 和 4.0 ng/L 。电化学信号和流动注射化学发光信号较传统的用 HRP 标记的抗体作为信号分子的检测信号分别放大了 14 和 13 倍^[4]。

本课题组选用具有电致化学发光(ECL) 活性的小分子 N,N -二异丙基乙二胺(DPEA) 作为信号分子。利用夹心免疫反应将标记有引发基团的 CEA 固定在电极或金片表面,选择具有环氧基的 GMA 单体进行 ATRP 反应,并将具有 ECL 活性的 N,N -二异丙基乙二胺(DPEA) 偶联在形成的聚合物的侧链上,制得 CEA 电致化学发光传感器。在最优实验条件下, CEA 浓度在 $0.001 \sim 1000 \mu\text{g/L}$ 范围内与 ECL 信号呈良好的线性关系,其检出限为 0.5 ng/L ^[4]。用该传感器对 17 个临床血样进行了检测,所得结果与临床电致化学发光方法得到的结果一致,为临床 CEA 的检测提供了一种选择。

上述传感器均是在电极或基质表面先形成聚合物,然后将信号分子(FcNH_2 , HRP, DPEA) 偶联到形成的聚合物的侧链上。为了简化分析步骤和提高分析产率,选用了具有电活性的 4-乙酰氧基苯乙烯作为单体(图 5)。利用夹心免疫反应将标记有引发基团的 IgG 固定到电极表面,选择具有乙酰基的 4-乙酰氧基苯乙烯为单体进行 ATRP 反应,扫描电子显微镜(SEM) 和 X 射线光电子能谱(XPS) 数据均证实了在电极表面形成了聚合物。形成的聚合物中含有的乙酰基经水合肼过程生成酚羟基,酚羟基在酪氨酸酶作用下会产生电化学信号。在最优实验条件下, IgG 浓度在 $5 \sim 65 \mu\text{g/L}$ 范围内与电化学信号呈

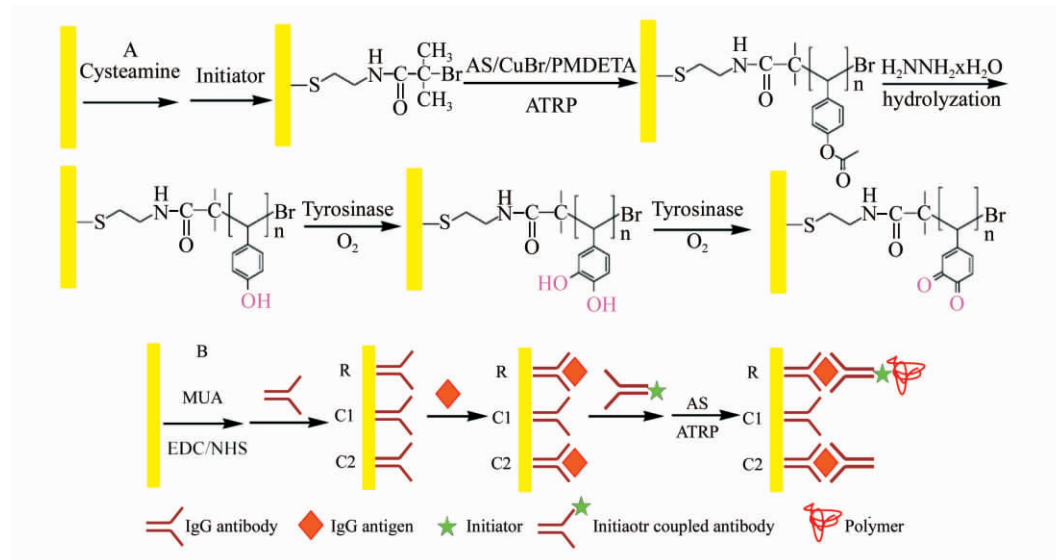


图 5 (A) 聚合物辅助信号放大方法结合电化学检测方法用于生物传感示意图; (B) 表面引发的原子转移自由基反应聚合 4-乙酰氧基苯乙烯单体,并用于免疫传感的示意图^[4]

Fig. 5 (A) Schematic illustration of the strategies used in the coupling of polymerization-assisted signal amplification with electrochemical detection for biosensing. (B) Schematic illustration of surface initiated atom transfer radical polymerization (SI-ATRP) of 4-acetoxystyrene (AS) for immunosensing^[4]

良好的线性关系,检出限为 $0.3 \mu\text{g/L}$ ^[4]。

ATRP 反应辅助的信号放大方法除了能与电化学、流动注射化学发光和电致化学发光方法相结合之外,还能与比色法相结合(图 6)。利用夹心免疫反应将标记有引发基团的 IgG 固定到纳米金表面,选

择具有活性羟基的甲基丙烯酸 2-羟乙酯(HEMA) 为单体进行 ATRP 反应,动态光散射和电动电位测量均证实了纳米金表面聚合物的形成,形成的聚合物改变了纳米金的光学性质,从而使溶液颜色发生了改变。用光谱吸收和比色法对 IgG 进行了检测,得到的检测范围是 0.5 ~ 25 $\mu\text{g/L}$,检出限是 0.03 $\mu\text{g/L}$ [43]。

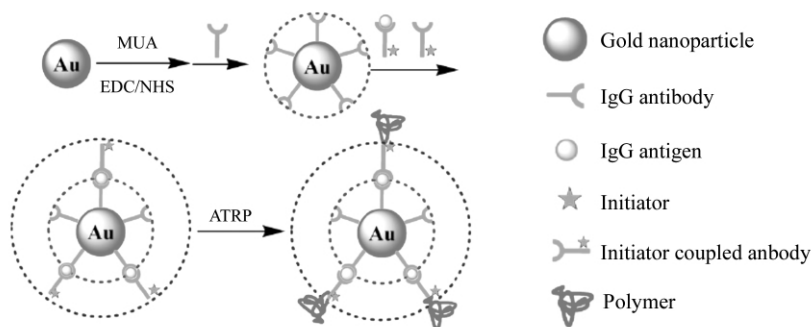


图 6 IgG 比色免疫传感器的制备示意图 [43]

Fig. 6 Schematic illustration for the colorimetric immunosensing [43]

5 结论与展望

ATRP 作为一种信号放大方法,有效提高了检测灵敏度,实现了疾病的早期诊断,具有非常重要的意义。但是,ATRP 用于生物传感还存在一些问题,如传感器制备时间比较长,步骤繁多,降低了临床使用效率;传感器体积比较大;ATRP 会影响蛋白质或细胞的生物活性,缩小了其应用范围;反应中需用金属盐作催化剂,对环境保护不利。其未来进一步的发展方向包括:(1) 通过各种新技术、新材料的生物兼容性,发展信号放大的新方法,建立灵敏度高、重现性好、抗干扰能力强的新型实用的生物传感器;(2) 加速生物传感器市场化、商品化的进程。低成本、高灵敏度、高稳定性一直是生物传感器追求的目标;(3) 生物传感器的微型化将为 DNA、肿瘤标志物和细胞地分析提供强有力的手段,使操作更简单、便捷;(4) 吸收纳米科技、微加工技术、电子信息和计算机技术的新成果,朝着功能多样化、体积微型化、应用智能化、信息集成化、检测一体化、操控自动化的方向发展,制备出新型生物传感器,应用于 DNA、肿瘤标志物和细胞的灵敏检测,为肿瘤疾病的诊断和治疗服务。

References

- Matyjaszewski K, Xia J H. *Chem. Rev.*, **2001**, 101(9): 2921-2990
- Srivastava A, Mishra V, Singh P, Kumar R. *J. Appl. Polym. Sci.*, **2012**, 126(2): 395-407
- Bunha A K, Mangadla J, Felipe M J, Pangilinan K, Advincula R. *Macromol. Rapid. Comm.*, **2012**, 33(14): 1214-1219
- Gilroy J B, Lunn D J, Patra S K, Winnik M A, Manners I. *Macromolecules*, **2012**, 45(14): 5906-5815
- Yao Z L, Tam K C. *Polymer*, **2012**, 53(16): 3446-3453
- Nguyen A T, Baggerman J, Paulusse J M J, Zuillhof H, van Rijn C J M. *Langmuir*, **2012**, 28(1): 604-610
- Nguyen A T, Baggerman J, Paulusse J M J, van Rijn C J M, Zuillhof H. *Langmuir*, **2011**, 27(6): 2587-2594
- Zhang Z B, Yuan S J, Zhu X L, Neoh K G, Kang E T. *Biosens. Bioelectron.*, **2010**, 25(5): 1102-1108
- Qian H, He L. *Anal. Chem.*, **2009**, 81(23): 9824-9827
- Wong A K Y, Krull U J. *Anal. Chim. Acta*, **2009**, 639(1-2): 1-12
- Lou X H, Lewis M S, He L. *Anal. Chem.*, **2005**, 77(15): 4698-4705
- Lou X H, He L. *Langmuir*, **2006**, 22(6): 2640-2646
- Wang J S, Matyjaszewski K. *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117(20): 5614-5615
- Matyjaszewski K. *Curr. Org. Chem.*, **2002**, 6(2): 67-82
- Matyjaszewski K, Ziegler M J, Arehart S V, Pakula T. *J. Phys. Org. Chem.*, **2000**, 13(12): 775-786
- Lutz J F, Neugebauer D, Matyjaszewski K. *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125(23): 6986-6993
- Lutz J F, Kirci B, Matyjaszewski K. *Macromolecules*, **2003**, 36(9): 3136-3145
- Hong S C, Lutz J F, Inoue Y, Strissel C, Nuyken O, Matyjaszewski K. *Macromolecules*, **2003**, 36(4): 1075-1082
- Hadjichristidis N, Pitsikalis M, Pispas S, Iatrou H. *Chem. Rev.*, **2001**, 101(12): 3747-3792
- Hong S C, Neugebauer D, Inoue Y, Lutz J F, Matyjaszewski K. *Macromolecules*, **2003**, 36(1): 27-35
- Pitsikalis M, Pispas S, Mays J W, Hadjichristidis N. *Blockcopolymers Polyelectrolytes Biodegradation*, **1998**, 135: 1-137
- Borner H G, Duran D, Matyjaszewski K, da Silva M, Sheiko S S. *Macromolecules*, **2002**, 35(9): 3387-3394
- Gaynor S G, Edelman S, Matyjaszewski K. *Macromolecules*, **1996**, 29(3): 1079-1081

- 24 Matyjaszewski K, Gaynor S G, Kulfan A, Muller A H E. *Macromolecules*, **1997**, 30(17) : 5192–5194
- 25 Matyjaszewski K, Gaynor S G, Muller A H E. *Macromolecules*, **1997**, 30(23) : 7034–7041
- 26 Matyjaszewski K, Gaynor S G. *Macromolecules*, **1997**, 30(23) : 7042–7049
- 27 Matyjaszewski K, Pyun J, Gaynor S G. *Macromol. Rapid. Comm.*, **1998**, 19(12) : 665–670
- 28 Matyjaszewski K. *Polym. Int.*, **2003**, 52(10) : 1559–1565
- 29 Beers K L, Gaynor S G, Matyjaszewski K, Sheiko S S, Moller M. *Macromolecules*, **1998**, 31(26) : 9413–9415
- 30 Luzinov I, Minko S, Tsukruk V V. *Prog. Polym. Sci.*, **2004**, 29(7) : 635–698
- 31 Pyun J, Kowalewski T, Matyjaszewski K. *Macromol. Rapid. Comm.*, **2003**, 24(18) : 1043–1059
- 32 Liu Y, Cheng Q. *Anal. Chem.*, **2012**, 84(7) : 3179–3186
- 33 Liu Y, Dong Y, Jauw J, Linman M J, Cheng Q. *Anal. Chem.*, **2010**, 82(9) : 3679–3685
- 34 Qian H, He, L. *Sensors and Actuators B*, **2010**, 150(2) : 594–600
- 35 He P, Zheng W M, Tucker E Z, Gorman C B, He L. *Anal. Chem.*, **2008**, 80(10) : 3633–3639
- 36 Wang J S, Matyjaszewski K. *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117(20) : 5614–5615
- 37 Chen J K, Li J Y. *Sensors and Actuators B*, **2010**, 150(1) : 314–320
- 38 Lou X H, He L. *Langmuir*, **2006**, 22(6) : 2640–2646
- 39 Zheng W M, He L. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2010**, 397(6) : 2261–2270
- 40 Wu Y F, Liu S Q, He L. *Anal. Chem.*, **2009**, 81(16) : 7015–7021
- 41 Wu Y F, Liu S Q, He L. *Analyst*, **2011**, 136(12) : 2558–2563
- 42 Wu Y F, Liu S Q, He L. *Biosens. Bioelectron.*, **2010**, 26(3) : 970–975
- 43 Wu Y F, Shi H Y, Yuan L A, Liu S Q. *Chem. Commun.*, **2010**, 46(41) : 7763–7765
- 44 Yuan L A, Wu Y F, Shi H Y, Liu S Q. *Chem. Eur. J.*, **2011**, 17(3) : 976–983
- 45 Shi H Y, Yuan L A, Wu Y F, Liu S Q. *Biosens. Bioelectron.*, **2011**, 26(9) : 3788–3793

Application of Atom Transfer Radical Polymerization in Biosensing

LI Ying, WU Ya-Feng, YUAN Liang, LIU Song-Qin*

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Southeast University, Nanjing 210096, China)

Abstract Atom transfer radical polymerization (ATRP) is a new class of signal amplification method. The polymer growth results in local accumulation of monomers to form long-chain polymers. The growth of long chain polymeric materials provides excess active groups for electroactive or photoactive molecules coupling, which in turn significantly increases the loading of signal molecules and enhanced detection sensitivity. This review introduced the mechanism of ATRP, summarized the recent application of ATRP in biosensing. Particularly, future study and prospect were envisioned.

Keywords Atom transfer radical polymerization; Signal amplification; Biosensing; Deoxyribonucleic acid; Protein; Review

(Received 23 May 2012; accepted 26 September 2012)