

聚集诱导发光分子在生物检测领域的应用

闫继明^①, 秦安军^①, 孙景志^{①*}, 唐本忠^{①②*}^① 浙江大学高分子科学与工程学系, 高分子合成与功能构造教育部重点实验室, 杭州 310027;^② 香港科技大学化学系, 九龙清水湾, 香港

* 联系人, E-mail: sunjz@zju.edu.cn; tangbenz@ust.hk

2009-11-01 收稿, 2010-01-12 接受

国家自然科学基金(批准号: 50873086)、国家重点基础研究发展计划(编号: 2009CB623605)和浙江省自然科学基金(编号: Z406018)资助项目

摘要 聚集诱导发光(AIE)是指一类荧光生色团在溶液状态下微弱发光甚至不发光, 而在固态或聚集状态下荧光显著增强的一种光物理现象. 具有 AIE 特性的分子作为荧光探针在生物检测领域有着传统荧光探针分子不能比拟的优点. 一方面可以使更多的 AIE 探针分子结合到生物大分子上获得高亮度的荧光, 而不必担心像传统的荧光分子那样发生聚集导致的荧光猝灭, 这为荧光检测提供了便利. 另一方面, 在聚集后发生的荧光急剧变亮的特性可以作为荧光放大检测的定量依据. 本文展示一些有代表性的具有 AIE 特性的分子, 重点介绍其在蛋白质、DNA、G4、手性有机胺等生物分子检测中的应用, 阐明 AIE 荧光探针的工作原理和特点, 并对 AIE 荧光探针的设计与应用给予展望.

关键词聚集诱导发光
荧光探针
硅杂环戊二烯
四苯基乙烯
生物分子

荧光探针在使用中普遍存在的一个问题是, 当荧光官能团聚集时会发生荧光减弱或猝灭的现象^[1]. 然而, 作为探针的荧光小分子通常含有难溶于水的芳香族结构, 因此它们有在水溶液中聚集的趋势; 另一方面, 当它们通过物理作用或者化学作用结合到生物分子上时, 这些荧光分子自发地发生聚集. 聚集的结果是导致发射的荧光信号大幅下降甚至消失. 所以, 为了避免荧光探针因为发生聚集而猝灭, 在使用过程中必须严格控制荧光探针的浓度以及在生物分子上结合的探针分子的数量. 这样荧光基团的浓度很低, 探针的荧光强度也就大大下降, 给检测带来了困难.

2001 年, Tang 研究组^[2]发现了一种奇特的现象, 一种名为硅杂环戊二烯的化合物(图 1 中所示化合物 1)在溶液状态下发光很弱; 当向溶液中加入非溶剂后, 体系变浑浊, 同时荧光强度急剧增大, 荧光量子效率显著升高, 这种现象与传统的聚集导致荧光猝灭恰好相反, Tang 等人将这种现象称为聚集诱导发光(aggregation-induced emission, 简称 AIE)现象. 具

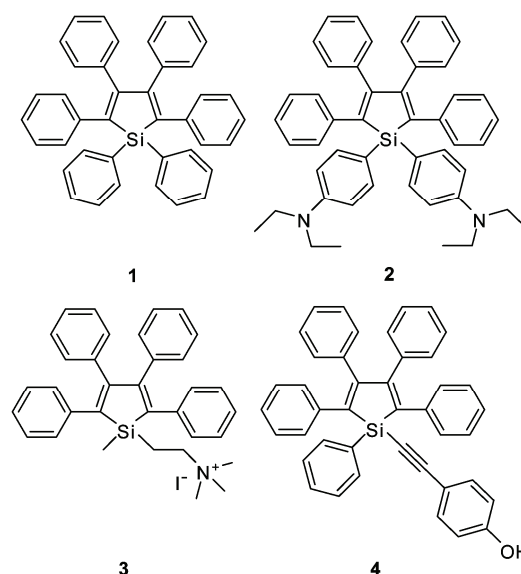


图 1 几种有代表性的硅杂环戊二烯衍生物的化学结构

有 AIE 特性的分子作为荧光探针在生物检测领域有着其他分子不能比拟的优点, 它们在聚集后所发生

英文引用格式: Yan J M, Qin A J, Sun J Z, et al. Application of AIE-active molecules in biosensing (in Chinese). Chinese Sci Bull (Chinese Ver), 2010, 55: 1206—1213, doi: 10.1360/972009-2307

的急剧变亮的特性可以作为检测的依据；它们结合到生物大分子上的分子数目可以比传统荧光探针多很多，相应的荧光强度也就大得多，这为检测探针所发出的荧光提供了便利。这些优势使聚集诱导发光分子在生物检测中得到重视，近几年相关研究取得若干重要进展，本文对其中一些代表性的工作给予简要综述。

1 硅杂环戊二烯及其衍生物

硅杂环戊二烯是典型的具有 AIE 特性的分子，当它溶解在良溶剂中时，用紫外光激发，苯环以其与硅杂环间的单键为轴进行分子内旋转，消耗掉激发的能量。然而在聚集状态下，由于分子的内旋转受限，苯环旋转的幅度大大减小，激发能不再通过分子内旋转消耗掉，所以会以光的形式释放出来。建立在硅杂环戊二烯基础上得到的各种衍生物大多具有 AIE 现象，在生物检测领域已经应用的几种硅杂环戊二烯及其衍生物分子结构如图 1 所示。

2004 年，Renneberg 研究组^[3]将化合物 1 用作生物探针，探针的制备过程如图 2(a)所示。先将重结晶后得到的化合物 1 的晶体通过研磨制成纳米晶体，再把纳米晶体加入到表面活性剂的水溶液中，表面活性剂的疏水部分与化合物 1 结合到一起，亲水部分在水相中，从而得到了分散性比较好的悬浮液，将得到的悬浮液加到 PAH-聚电解质，形成包覆结构后，除去多余的 PAH-聚电解质，加入 PSS-聚电解质，化合物 1 的晶体表面包覆了两层聚电解质，抗体可以吸附在表面的聚电解质层上，分子探针就制备好了。图 2(b)是硅杂环戊二烯生物探针的工作原理示意图。把抗体固定在硅基表面，被检测的生物分子结合在抗

体上，加入分子探针后探针可以与被检测物结合，结合后荧光探针被固定在硅基表面，所以可以通过荧光信号检测结合事件的发生。经实验证明，由于硅杂环戊二烯具有 AIE 性质，避免了普通荧光分子存在的聚集猝灭的现象，所以探针与生物分子的摩尔比较大，是一种比较理想的荧光探针。

2007 年，Dong 等^[4]合成了图 1 中的化合物 2。它不仅具有聚集诱导发光性质，而且因为带有两个可以在较低 pH 值下质子化的氨基，质子化后的化合物 2 可溶于水，发光很弱。当 pH 大于 5.4 时，因氨基去质子化，化合物 2 在水溶液中不再溶解而发生聚集，从而荧光大大增强。根据这个原理，这个分子可以作为 pH 5.4 左右的荧光指示剂。为了验证这个分子作为生物探针的可能性，将化合物 2 溶解在 pH 2.0 的缓冲液中，这时化合物 2 的氨基被质子化，分子溶解于缓冲液中，所以发光很弱。在加入了牛血清蛋白 (BSA) 以后，溶液开始变亮，而且随 BSA 加入的量的增加，溶液荧光增强，这证明化合物 2 是很好的蛋白质检测剂。将化合物 2 溶解在缓冲液中，逐渐加入鲑鱼精子的 DNA，随 DNA 的量加入，溶液的荧光大大增强，这说明化合物 2 同时也是很好的 DNA 探针。化合物 2 之所以能够检测蛋白质，是因为化合物 2 分子中的众多苯环具有疏水作用，而蛋白质具有疏水的折叠结构，由于疏水相互作用加上静电相互作用，化合物 2 易于与蛋白质结合。化合物 2 之所以能够检测 DNA，是因为在酸性水溶液中质子化的氨基是阳离子型的，鲑鱼精子 DNA 分子是显电负性的，所以化合物 2 与 DNA 具有较强的静电吸引作用，同时由于分子中苯环的疏水作用，化合物 2 易于结合到 DNA 分子表面。与蛋白质或 DNA 结合后，分子内旋

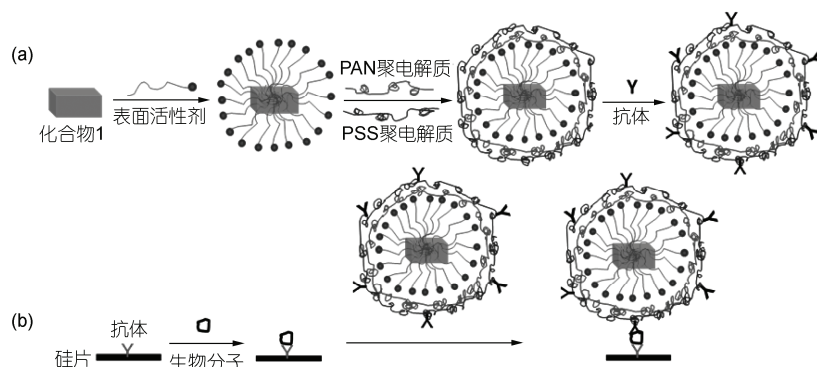


图 2 含化合物 1 的荧光探针的制备方法(a)和化合物 1 作为生物探针的工作原理示意图(b)

转受限, 导致荧光增强.

Wang 等人^[5]利用化合物 **3** 作为探针检测 DNA, 并可以检测 DNA 长链的断裂. 图 3(a) 显示了化合物 **3** 的检测过程. 化合物 **3** 在溶液中处于溶解状态时, 发光很弱. 当加入 DNA 以后, 由于与 DNA 分子的静电相互作用及疏水作用, 化合物 **3** 在 DNA 分子上聚集, 所以发光大大增强. 这种在加入 DNA 后迅速变亮的特性是化合物 **3** 作为 DNA 探针的基础. 作者选择了一些单链 DNA 和双链 DNA 作为实验对象, 证实了这种衍生物是很好的 DNA 探针. 另一方面, 如果 DNA 分子链在反应中发生了断裂, 探针分子的聚集程度就会下降, 从而导致所发出的荧光减弱, 所以化合物 **3** 还可以作为 DNA 分子链断裂的检测试剂.

化合物 **3** 除了用于检测 DNA 和 DNA 链的断裂, Wang 等人^[6]还将其用于肝磷脂的检测及肝磷脂与蛋白质相互作用的监测, 这个过程如图 3(b) 所示. 肝磷脂是表面带有负电荷的生物大分子. 肝磷脂可以用来治疗各种弥散性血管内凝血, 在肝磷脂的使用过程中, 对其监测和控制十分重要. 化合物 **3** 中的铵基使其可溶于水, 所以在水溶液中发光很弱, 但是在聚集状态下发光大大增强. 向发光很弱的化合物 **3** 的缓冲溶液(pH 7.4)中加入肝磷脂, 溶液发光大大增强. 推断这是由于化合物 **3** 的铵基阳离子与肝磷脂的磷酸根阴离子及羧酸根阴离子发生了静电相互作用, 化合物 **3** 结合到肝磷脂表面而发生了聚集, 从而发光大大增强. 化合物 **3** 能够检测的最小肝磷脂浓度可以达到 23 nmol/L, 当肝磷脂的浓度为 13 $\mu\text{mol/L}$ 时, 由于分子聚集, 化合物 **3** 的吸收峰从没有聚集时的 356 nm 移动到聚集后的 365 nm, 发射峰波长由 480 nm 变为 488 nm, 发光强度增加了 92 倍. 此外, 分别在阴离子

相对较少的氨基多糖, 硫酸软骨素和透明质酸, 及呈电中性的简单的多羟基糖——葡聚糖存在下, 化合物 **3** 的荧光性质也被进行了研究. 结果表明, 化合物 **3** 与它们混合后发光强度由大到小的顺序为肝磷脂>硫酸软骨素>透明质酸>葡聚糖. 肝磷脂可以使化合物 **3** 的发光强度大大增加, 而葡聚糖使化合物 **3** 的发光强度的影响几乎可以忽略. 这样的结果与每个分子上的负电荷数量是有对应关系的, 肝磷脂具有最多的负电荷数, 葡聚糖没有阴离子, 这表明化合物 **3** 可以用作肝磷脂的特异性检测. 为了证明化合物 **3** 用于检测肝磷脂的实用性, 用马血清作为研究对象来检验化合物 **3** 对肝磷脂的灵敏度. 马血清中含有白蛋白、球蛋白、黏纤维素和包括羧酸盐在内的各种离子. 在不加入肝磷脂的前提下, 将化合物 **3** 加入到马血清中, 可能是由于静电作用或疏水相互作用, 化合物的发光增强了. 逐渐加入肝磷脂, 化合物 **3** 的发光强度变得更强, 扣除掉马血清存在下引起的荧光增强影响, 发现肝磷脂浓度在 0~12 $\mu\text{mol/L}$ 范围内, 化合物 **3** 的发光强度与肝磷脂的加入量成正比. 在手术或临床抗凝血剂药物治疗中, 肝磷脂的浓度通常在 0.8~3.2 $\mu\text{mol/L}$ 范围内, 因此化合物 **3** 是个非常有应用前景的肝磷脂荧光检测剂. 此外, 肝磷脂能够特异性地与一些蛋白质结合, 精蛋白就是其中之一. 如图 3(b) 所示, 将化合物 **3** 加入到含有肝磷脂的缓冲溶液中, 溶液变得发光, 再将精蛋白加入到化合物 **3**/肝磷脂溶液中, 精蛋白通过与肝磷脂的相互作用与结合在肝磷脂上的化合物 **3** 竞争, 使得化合物 **3** 从肝磷脂上脱离下来, 重新溶解在水中, 由于不再是聚集状态, 所以发光大大减弱. 因此, 化合物 **3** 还可以用于研究肝磷脂与蛋白质的相互作用.

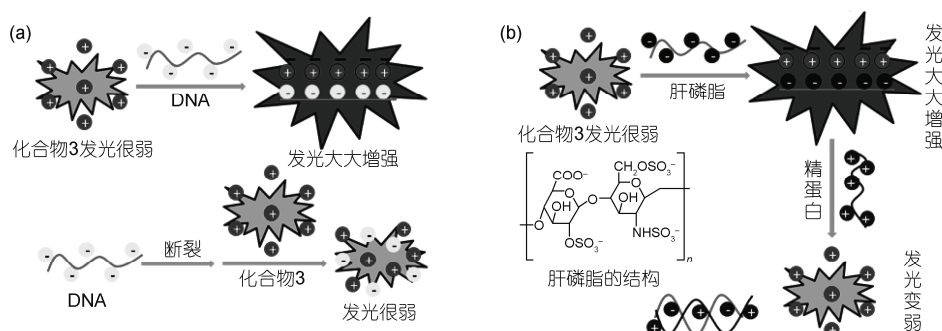


图 3 化合物 **3** 作为 DNA 探针和 DNA 分子链发生断裂指示剂的过程示意图(a)和化合物 **3** 作为肝磷脂探针及肝磷脂与蛋白质相互作用的指示剂示意图(b)

带有酚羟基的硅杂环戊二烯衍生物也被合成出来并应用在生物检测领域. Tang 研究组^[7]合成了化合物 **4**, 它同样具有聚集诱导发光的性质, 在稀溶液中发光很弱. 当加入了 BSA 以后, 化合物 **4** 的发光强度随着 BSA 的浓度增加而增强, 当 BSA 的浓度为 15% 时, 化合物 **4** 的发光强度达到了未加 BSA 时的发光强度的 15 倍. 为证实该化合物 **4** 可以作为蛋白质探针, 作者还实验了其他几种蛋白质, 包括胃蛋白酶、白蛋白、溶解酵素和木瓜蛋白酶, 实验结果显示, 该硅杂环戊二烯衍生物对这些蛋白质都有较高的灵敏度. 为了验证化合物 **4** 对 DNA 的检测效果, 作者将鲑鱼精子的 DNA 加入到化合物 **4** 的溶液中, 发现荧光强度随 DNA 加入的量增大而增强, 作为对比, 摩尔浓度相同的 BSA 和鲑鱼精子 DNA 溶液, 鲑鱼精子 DNA 溶液的发光强度比牛血清蛋白溶液的发光强度要大得多, 这说明化合物 **4** 对鲑鱼精子 DNA 的亲和力更强. 作者对乳牛胸腺 DNA、鲑鱼 DNA 进行了类似的实验, 意外地发现鲑鱼 DNA 的加入并没有引起荧光强度的变化, 乳牛胸腺 DNA 的加入也只引起了很弱的荧光. 此外, 作者又实验了 RNA R6625 和 RNA R3629, 发现 RNA R6625 会比 RNA R3629 引起的荧光增强的效果更显著. 这些事实表明, 化合物 **4** 与各生物大分子的相互作用不同, 它的检测是具有选择性的.

2 四苯基乙烯(TPE)衍生物

在具有聚集诱导发光性质的化合物中, TPE 及其衍生物的发光性能优良, 合成简便, 以 TPE 及其衍生

物作为探针是 AIE 现象在生物检测领域应用的一个重要组成部分. 目前用于生物检测的 TPE 衍生物分子如图 4 所示.

Tong 等^[8]合成了化合物 **5** 和 **6**, 化合物 **5** 不溶于水, 但当其以盐的形式存在时, 即化合物 **6** 可溶于水. 化合物 **5** 被证实可以作为蛋白质探针, 但是它必须要转变成盐的形式才可以被使用, 这在实际使用时是不方便的, 而且苯酚的阴离子盐是不稳定的, 这是因为它可能转变成苯醌. 相对化合物 **5**, 水溶性化合物 **6** 的结构更加稳定, 而且不需要预处理, 因此更便于使用. 为验证化合物作为蛋白质探针的可能性, 将其溶解在 pH 7.0 的磷酸缓冲液中, 溶液此时几乎不发光, 在加入了少量 BAS 后, 溶液的发光强度明显增强, 且随 BAS 浓度的增大发光强度增大而增强, 当 BAS 的浓度为 500 $\mu\text{g/mL}$, 化合物 **6** 的量子效率达到 58% 左右, 最大斯托克斯位移达到 152 nm, 最大发射光波长为 472 nm, 其对应的激发光波长为 332 nm. 由于化合物 **6** 的发光强度与 BAS 浓度成正比, 因此化合物 **6** 可以用来对蛋白质定量检测. 具有 AIE 性质的分子在加入 BAS 后发光, 可能是由于 BAS 折叠结构含有疏水的囊袋, TPE 衍生物分子可能结合到 BAS 分子链上的疏水部分, 然后进入到疏水的囊袋中, 在这里 TPE 衍生物分子内旋转被受阻, 激发光的能量以光的形式放射出来, 而不再以分子内旋转的形式消耗.

Tong 等^[9]合成了化合物 **7** 和 **8**, 它们是溶于水的, 在水溶液中发光很微弱. 可能是由于这两个分子同时具有亲水和疏水的结构, 分别将甲醇、乙腈、四氢

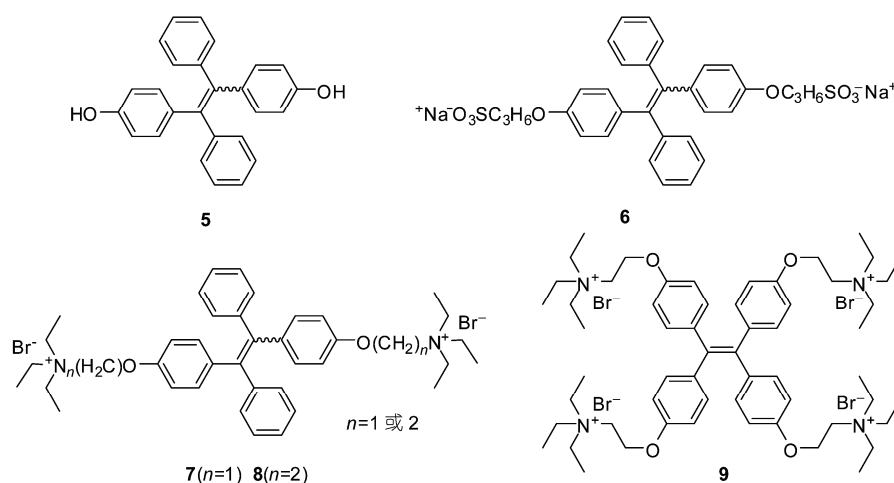


图 4 几种用于生物检测领域的 TPE 衍生物的化学结构

呋喃和二氧乙烷加入到化合物 **7** 或 **8** 的水溶液中, 并不能使化合物 **7** 或 **8** 发生聚集, 溶液的发光仍然很微弱. 然而随化合物 **7** 或化合物 **8** 在溶液中浓度的增加, 溶液的发光变强, 这说明这两个分子是具有聚集诱导发光现象的. 配制浓度为 0.25 mmol/L 的化合物 **7** 的水溶液, 将 100 μL 此水溶液与 9.9 mL 磷酸缓冲液 (pH 7.0) 混合均匀, 溶液发光很弱. 随着乳牛胸腺 DNA 的加入, 化合物 **7** 所发出的荧光强度增加到原来的 5.4 倍. 在 0~100 $\mu\text{g/mL}$ 的牛胸腺 DNA 浓度范围内, 随着 DNA 浓度增大, 化合物 **7** 的发光强度随 DNA 浓度线性增加. 向化合物 **7** 的磷酸缓冲液中加入 BAS, 当浓度在 0~50 $\mu\text{g/mL}$ 范围变化时, BAS 的加入引起的变化与加入 DNA 引起的变化相似, 也呈现线性关系. 生物大分子的加入对化合物 **8** 的荧光强度的影响更加显著, 当牛胸腺 DNA 浓度为 300 $\mu\text{g/mL}$ 时, 化合物 **8** 的荧光强度增强到了未加时荧光强度的 16.3 倍; 当 BAS 的浓度为 500 $\mu\text{g/mL}$ 时, 荧光强度增加到了未加时荧光强度的 23.8 倍. 很明显, 化合物 **8** 是更加敏感的探针, 它的激发光波长最大值为 328 nm, 斯托克斯位移为 135 nm 左右. 化合物 **8** 的发射光强度与牛胸腺 DNA 浓度呈线性关系的牛胸腺 DNA 浓度范围为 0~20 $\mu\text{g/mL}$; 化合物 **8** 的发射光强度与 BAS 浓度呈线性关系的 BAS 的浓度范围为 0~40 $\mu\text{g/mL}$. 与化合物 **7** 相比, **8** 的发射光强度与生物大分子呈线性关系的区域变小. 可见化合物 **7** 和 **8** 能够作为 DNA 和蛋白质的探针. 为了证明 **7**

和 **8** 之所以在加入生物大分子后明显发光, 是由于分子内旋转受限而引起的聚集诱导发光现象, 将化合物 **8** 溶解在高黏度的丙三醇与水的体积比为 99:1 的混合溶液中, 由于溶液黏度较高, 分子的内旋转受到抑制, 因此常温下可以观察到荧光发射. 当温度降低至 -5°C , 化合物 **8** 的发光强度大大增加. 这与加入生物大分子对化合物 **8** 发光的影响很接近. 可以认为化合物 **7** 和 **8** 之所以在溶液中加入 DNA 和蛋白质后荧光增强, 是因为存在诸如静电作用或疏水相互作用等非共价键的影响, 限制了分子的内旋转, 导致荧光显著增强.

Hong 等^[10]将化合物 **9** 作为 DNA 及 G 四倍体和 K^+ 的探针被进行了实验, 整个过程如图 5 所示. 化合物 **9** 是溶解于水的盐, 由于它具有两亲结构, 向化合物 **9** 的水溶液中分别加入乙腈、四氢呋喃和甲醇都不能使其聚集, 化合物 **9** 在所有的这些溶液中发光都很弱. 25°C 下, 将化合物 **9** 溶解在丙三醇与水的混合溶剂中, 由于黏度的增大, 化合物 **9** 发出较强的波长为 464 nm 的蓝色光. 将温度降至 -78°C , 化合物 **9** 所发出的光强度大大增强, 温度的降低使溶液的黏度大大增大, 分子 **9** 内旋转的阻力变大, 发光变强, 这是典型的 AIE 现象. 以寡核苷酸 G1(G1=5'-GGGTTAGGGTTAGGGT-3')作为 DNA 分子模型, 向分子 **9** 的浓度为 4.5 $\mu\text{mol/L}$ 的缓冲溶液中加入 G1, 出现了溶液发光增强的现象, 当 G1 的浓度达到 5 $\mu\text{mol/L}$ 时发光强度达到最大, 再补加 G1, 发光强度变化不大.

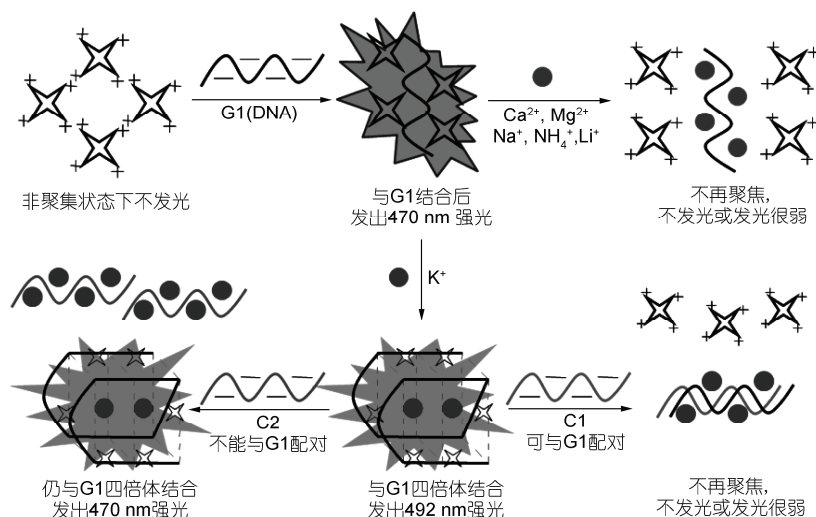


图5 化合物 **9** 作为 DNA, G 四倍体和 K^+ 探针过程的示意图

在缓冲溶液中, G1 呈无规线团结构, 它的圆二色谱信号很弱. 向 G1 的缓冲溶液中加入 K^+ , 使 G1 更易形成 G 四倍体结构, 圆二色谱的轮廓发生改变, 同时椭圆率也增加了. G1/化合物 **9**/ K^+ 体系的圆二色谱的轮廓和椭圆率与 G1/ K^+ 体系的相似, 这说明分子 **9** 的加入并没有影响四倍体结构. G1 的四倍体结构同时引起了化合物 **9** 的激发光和发射光大约 20 nm 的红移. 滴定实验揭示: 上述的红移从 K^+ 浓度约为 10 mmol/L 开始, 到 K^+ 浓度约为 100 mmol/L 结束.

改变 G1、化合物 **9**、 K^+ 的加入顺序组合, 荧光强度和圆二色谱信号强度是有差异的; 其中将 K^+ 加入到化合物 **9**/G1 体系中的荧光和 CD 信号最强. 向化合物 **9**/G1 体系中加入其他阳离子, 包括 Na^+ , Li^+ , NH_4^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , 都会引起 TTAPE 发光的减弱, 这些阳离子会与化合物 **9** 竞争吸附到 G1 表面, 使得化合物 **9** 回到溶液中, 分子内旋转不再受到大的限制, 导致发光变弱. 这个现象为化合物 **9** 作为检测 K^+ 的探针提供了依据.

C1(C1=5'-CCCTAACCCTAACCCTAACCC-3') 也是一种寡核苷酸, 但是不含有 G 嘌呤. 将 C1 与化合物 **9** 同时溶解在缓冲液中, 化合物 **9** 会结合到 C1 上导致分子内旋转受限而发出波长为 474 nm 的蓝光. 分别加入上述阳离子, 包括 K^+ 在内的这些阳离子都会引起发光的减弱. C1 不能像 G1 那样在 K^+ 存在下形成 G 四倍体, 加入的 K^+ 与化合物 **9** 竞争吸附到 C1 的表面, 从而导致了荧光的减弱. 由于 C1 与 G1 可以配对形成 DNA 双链结构, 所以向形成 G 四倍体结构的 G1 溶液中加入 C1, 会导致 G 四倍体结构打开, 使 G1 与 C1 形成双链结构. 作为对照, 不能与 G1 结合的 C2(C2=5'-CCCAATCCCAATCCCAATCCC-3') 被加入到已形成 G 四倍体结构的 G1 溶液中, 并不能引起 G 四倍体结构的打开, 化合物 **9** 发光仍很强.

3 其他具有 AIE 现象的分子在生物检测领域中的应用

硅杂环戊二烯和 TPE 衍生物是较早得到研究的 AIE 活性分子, 随着更多具有 AIE 现象的其他结构的分子被开发出来, 应用在生物检测领域的分子出现更多的选择, 图 6 中给出两种有特点的化合物^[11,12].

将 L-**10** 分别与 **14**~**17** 溶解于合适的溶剂中, 如表 1 所示, L-**10** 与 (1*S*,2*R*)-**14** 在二氯乙烷中等摩尔比混合得到的溶液是澄清的, 加入一定量的水可以使其变成悬浮液, 但是再补加少量的乙醇, 混合物又变成澄清溶液. 用同样的条件实验, (1*R*,2*S*)-**14** 仍然保持悬浮状态. 对其他的几个化合物用同样的方法实验, L-**10** 与 (2*S*)-**15**, (1*R*,2*R*)-**16**, (*R*)-**17** 的混合物最终也是悬浮液, L-**10** 与 (2*R*)-**15**, (1*S*,2*S*)-**16**, (*S*)-**17** 的混合物最终为澄清的溶液. 这样的结果说明, L-**10** 与胺类手性化合物的相互作用不受溶剂极性的影响. 在相同的条件下, 将 D-**10** 与胺类手性化合物 **14**~**17** 混合, 发现 D-**10** 与 (1*S*,2*R*)-**14**, (2*R*)-**15**, (1*S*,2*S*)-**16** 的混合物更易形成悬浮液, D-**10** 与 (1*R*,2*S*)-**14**, (2*S*)-**15**, (1*R*,2*R*)-**16** 的混合物更易形成澄清溶液, 但化合物 **17** 是个例外, D-**10** 与 R-**17** 更易形成悬浮液, 与 S-**17** 更易形成澄清溶液. 这些实验证明: 化合物 L-**10** 和 D-**10** 与胺类手性化合物的异构体的相互作用是不同的. 由于化合物 L-**10** 与 D-**10** 具有聚集诱导发光的性质, 当它们完全溶解, 混合物呈溶液状态时, 发光很弱; 而当混合物是悬浮液或它们从溶液中沉淀出来时, 就会发出很强的光. 所以, 可以通过化合物 L-**10** 和 D-**10** 发射荧光的强度来辨别胺类手性化合物的异构体. 配制异构体摩尔比不相同的一系列化合物 **14** 的溶液, 化合物 **14** 总的摩尔浓度为 5.0×10^{-4} mol/L, 在相同的条件下分别用 L-**10** 和 D-**10** 检测, 结果显示 L-**10**

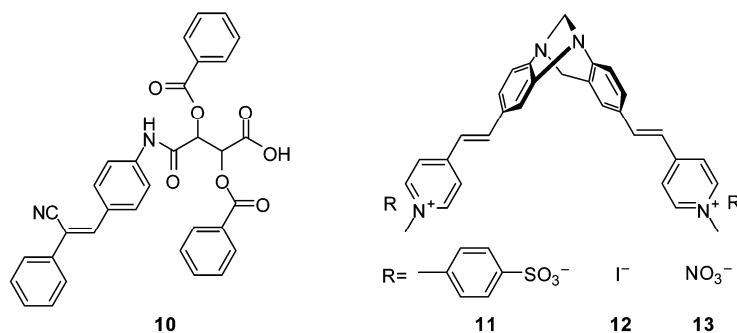


图 6 两种具有 AIE 性能的新型化合物的化学结构

表1 L-10与胺类化合物14~17在溶剂中的作用结果^{a)}

胺类化合物	状态	胺类化合物	状态
(1 <i>S</i> ,2 <i>R</i>)-14	溶液	(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)-16	悬浮液 ^{b)}
(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>)-14	沉淀	(1 <i>S</i> ,2 <i>S</i>)-16	溶液 ^{b)}
(2 <i>R</i>)-15	溶液	(<i>R</i>)-17	沉淀
(2 <i>S</i>)-15	悬浮液	(<i>S</i>)-17	溶液

a) 约5℃下, 0.02 mol/L的L-10和0.02 mol/L的胺类分子加入到1,2-二氯乙烷中; b) 0.01 mol/L的L-10和0.01 mol/L的胺类分子加入到体积比为3:2的正己烷/1,2-二氯乙烷混合溶剂中

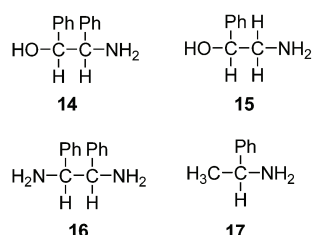


图7 供化合物L-10和D-10检测用的具有手性结构的胺类

和D-10对异构体的组成具有特异性反应, 发光的强度随异构体的摩尔比而变化, 这可以用来对旋光异构体进行纯度分析. 用相同的方法, 化合物15~17也可以依此原理进行纯度分析. 由此可见, 化合物10是简便的氨类手性化合物检测和定量分析的试剂.

Tao等^[12]合成了具有AIE性质的吡啶盐(分子11~13), 它们都易溶于极性溶剂如甲醇、乙醇、N,N-二甲基甲酰胺和水等, 完全不溶于非极性溶剂如乙醚、甲苯和苯等. 它们在稀溶液中发光很弱; 但在聚集态时, 可以发射强烈的黄光; 这是典型的聚集诱导发光的现象. Tao等^[12]尝试将该类分子用于蛋白质检测, 以BAS为例考察这三种分子对蛋白质的检测性能. 化合物11在PBS缓冲溶液(pH 7.0)中几乎不发光, 向溶液中加入BAS后仍然不发光, 这可能是由于分子11的特殊结构不易插入到蛋白质上与荧光探针结合的位置上. 然而, 向溶液中补加阴离子表面活性剂SDS后发光大大增强了, 这可能是由于表面活性剂使得蛋白质变性, 蛋白质的折叠链打开, 分子11可以通过疏水相互作用或静电吸引作用结合到蛋白质表面, 由于分子的内旋转受限而发光增强. SDS对分子11检测蛋白质起到了协同作用, 为确定这种影响,

向分子11和BAS的PBS缓冲溶液中分别加入不同量的SDS, 以此来确定表面活性剂SDS加入量的最佳值. 结果发现, 当SDS的浓度为0.05%(质量体积比)引起的荧光增强效果最明显. 同时, 在没有加入BAS的情况下, SDS也会引起分子11的发光增强, 所以使用过程中, 在未加入分子11之前, 需要先把SDS与牛血清蛋白充分混合. 当分子11的PBS缓冲液(pH 7.0)浓度为10 μmol/L, SDS的含量为0.05%时, BSA加入的量逐渐增加, 溶液的发光强度也随之增加, 当BSA的浓度在0~70 μg/mL范围内, 溶液的荧光强度与BSA的浓度呈正比关系, 这种线性关系可以被用来对蛋白质的含量进行检测. 分子12和分子13的性质与分子11的性质类似, 可以用来检测蛋白质, 同样, 在一定的BSA浓度范围内, 分子12和13的发光强度与BSA的浓度呈正比, 与分子11类似, 也可以用来分析蛋白质的含量.

4 结论与展望

在过去的几年里, AIE现象从被发现到逐渐被认识和理解, 同时发展成为化学家和生物学家手中的基本工具. AIE分子的设计合成以及前面给出的若干研究实例在蛋白质、DNA、G4、手性化合物检测等多个领域初步证实了其应用的可行性.

但是, 对新的AIE化合物的设计的需求, 特别是与生物分子结合的动力学和选择性的改进的需求依然存在. 大体积的生色团和在自由状态下可旋转的苯环似乎是AIE分子必不可少的结构要素, 但是这样的形体在和生物分子作用过程中构象的调整需要精心的设计和考虑, 这是摆在化学家面前的一个挑战. 各种生物学相容性的结构修饰也要策略性地予以采用, 以适应那些生命体系中原本存在的作用方式.

从AIE分子自身形体特点来说, 它们更适于做表面研究而不适于深入到一个生物结构的内部, 因为其自身由多个苯环构建的疏水生色团和支化的空间结构容易引起生命体系的“排异”反应. 因此扩展AIE的研究到生物膜的表面功能探测、信使分子的标记、信息的捕获等研究领域是一个充满期待的发展方向.

参考文献

- 1 Birks J B. Photophysics of Aromatic Molecules. London: Wiley, 1970
- 2 Luo J, Xie Z, Lam J W Y, et al. Aggregation-induced emission of 1-methyl-1,2,3,4,5-pentaphenylsilole. Chem Commun, 2001, (18): 1740

—1741

- 3 Chan C P, Haeussler M, Tang B Z, et al. Silole nanocrystals as novel biolabels. *J Immunol Methods*, 2004, 295: 111—118
- 4 Dong Y, Lam J W Y, Qin A, et al. Endowing hexaphenylsilole with chemical sensory and biological probing properties by attaching amino pendants to the silolyl core. *Chem Phys Lett*, 2007, 446: 124—127
- 5 Wang M, Zhang D, Zhang G, et al. Fluorescence turn-on detection of DNA and label-free fluorescence nuclease assay based on the aggregation-induced emission of silole. *Anal Chem*, 2008, 80: 6443—6448
- 6 Wang M, Zhang D, Zhang G, et al. The convenient fluorescence turn-on detection of heparin with a silole derivative featuring an ammonium group. *Chem Comm*, 2008, (37): 4469—4471
- 7 Li Z, Dong Y, Lam J W Y, et al. Functionalized siloles: Versatile synthesis, aggregation-induced emission, and sensory and device applications. *Adv Funct Mater*, 2009, 19: 905—917
- 8 Tong H, Hong Y, Dong Y, et al. Protein detection and quantitation by tetraphenylethene-based fluorescent probes with aggregation-induced emission characteristics. *J Phys Chem B*, 2007, 111: 11817—11823
- 9 Tong H, Hong Y, Dong Y, et al. Fluorescent “light-up” bioprobes based on tetraphenylethylene derivatives with aggregation-induced emission characteristics. *Chem Commun*, 2006, (35): 3705—3707
- 10 Hong Y, Haussler M, Lam J W Y, et al. Label-free fluorescent probing of G-quadruplex formation and real-time monitoring of DNA folding by a quaternized tetraphenylethene salt with aggregation-induced emission characteristics. *Chem Eur J*, 2008, 14 : 6428—6437
- 11 Zheng Y S, Hu Y J. Chiral recognition based on enantioselectively aggregation-induced emission. *J Org Chem*, 2009, 5660—5663
- 12 Yuan C X, Tao X T, Wang L, et al. Fluorescent turn-on detection and assay of protein based on lambda-shaped pyridinium salts with aggregation-induced emission characteristics. *J Phys Chem C*, 2009, 113: 6809—6814

Application of AIE-active molecules in biosensing

YAN JiMing¹, QIN AnJun¹, SUN JingZhi¹, TANG BenZhong^{1,2}

¹ *Department of Polymer Science & Engineering, Institute of Biomedical Macromolecules, Key Laboratory of Macromolecular Synthesis and Functionalization of the Ministry of Education of China, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China;*

² *Department of Chemistry, The Hong Kong University of Science & Technology, Hong Kong, China*

Aggregation-induced emission (AIE) refers to a unique photophysical phenomenon observed for some specific fluorophores, which are faintly or non-emissive in solution but become highly emissive in solid and aggregated states. In the cases of fluorescent probes, AIE active molecules possess some unparallel advantages over their classical counterparts. On one hand, it allows more AIE active molecules to bind to the target analyte, without worrying about the aggregation-induced fluorescence quenching; thus favors fluorescence detection. On the other hand, the feature of drastic enhancement in fluorescence intensity associating with an aggregation event can be used as a method of quantitative detection. In this paper, a series of representative AIE molecules are demonstrated; their applications as biological probes in sensing of protein, DNA, G4, and chiral amines are highlighted; their working principles and features of these molecules are described. Finally, a brief outlook on the design of new AIE-active molecules and the application of AIE-molecules in relevant fields is forwarded.

aggregation-induced emission, fluorescent probe, silole, tetraphenylethylene, biomolecules

doi: 10.1360/972009-2307