

荧光探针技术在分析化学教学中的应用案例研究--以共轭聚噻吩为例

刘典典 焦泽洋 钊培杰 刘鹏 郎云贺

华北理工大学

DOI:10.12238/jief.v7i2.12818

[摘要] 共轭聚噻吩(PT)凭借其独特的 π -共轭结构、可调控的生物相容性及环境刺激响应特性,成为极具潜力的荧光探针材料,用于分析物检测。其通过静电、疏水等作用与目标分析物结合后,可引发骨架构象或聚集状态变化,紫外-可见分光光度法可检测光学响应。本研究以聚噻吩为案例载体,系统探讨了荧光探针技术在分析化学教学中的创新应用模式。研究重点分析了共轭聚噻吩探针的检测机制及其在分子检测中的典型案例,将其融入创新项目和课程的教学,有助于学生的创新思维培养。

[关键词] 生物分析教学; 共轭聚噻吩; 光学生物传感技术; 教学案例

中图分类号: G633.91 **文献标识码:** A

A Case Study on the Application of Fluorescent Probe Technology in Analytical Chemistry Education: Taking Conjugated Polythiophene as an Example

Diandian Liu Zeyang Jiao Peijie Zhao Peng Liu Yunhe Lang

North China University of Science and Technology

[Abstract] Conjugated polythiophene (PT), with its unique π -conjugated structure, tunable biocompatibility, and environmental stimulus-responsive characteristics, has emerged as a highly promising fluorescent probe material for analyte detection. Upon binding with target analytes through electrostatic interactions, hydrophobic interactions, or other intermolecular forces, PT undergoes skeletal conformational changes or aggregation state transitions, which can be monitored through optical responses detected by UV-Vis spectrophotometry. This study employs polythiophene as a model system to systematically explore innovative application models of fluorescent probe technology in analytical chemistry education. By focusing on the detection mechanisms of conjugated PT probes and their representative applications in molecular sensing, we integrate these cutting-edge cases into innovative projects and curriculum design. This pedagogical approach significantly enhances the cultivation of students' innovative thinking capabilities, bridging theoretical knowledge with practical analytical problem-solving skills in real-world scenarios.

[Key words] Biochemistry Teaching; Conjugated Polythiophene; Optical Biosensing Technology; Teaching Case

引言

在分析检测领域,聚噻吩(PT)作为典型的 π -共轭聚合物,因其独特的离域电子结构和环境刺激响应性,成为分析化学课堂教学中的典型案例。PT主链为噻吩重复单元,化学稳定性高;具备独特的光学性质(如强荧光发射、高摩尔消光系数、信号放大效应),且热化学稳定性高、易于修饰。PT能够将化学环境变化,如溶剂、温度、离子或与其它底物的结合转变为光谱信号,通过紫外-可见光谱、荧光光谱甚至肉眼观察^[1]。这种生物信号放大—光谱检测的特性,既能帮助学生理解PT的构效关系,又能

直观解释生物分析的识别原理。目前,PT已被开发为多种生物分子检测的教学案例,涵盖蛋白和氨基酸、核酸、生物小分子等检测体系。其在基因传递、荧光成像等领域的应用案例,更能有效激发学生对跨学科技术整合的兴趣。将这类前沿聚合物引入教学,不仅能丰富教学内容,更可通过真实科研案例的转化,培养学生的创新思维与实践能力。

1 聚噻吩的合成和分类

在聚噻吩(PT)用于分析化学生物分析教学前,学生需要了解PT的合成方法以及分类。通过向学生介绍阅读文献、查阅文

献的方法,总结PT的合成和分类。PT的合成方法主要包括化学氧化聚合、电化学聚合和金属催化偶联法^[2]等^[3]。1980年,Yamamoto等^[2]在金属Ni催化剂的作用下,通过2,5-二溴噻吩单体的缩聚反应,首次合成了PT。但该PT不含取代基,主链刚性结构,导致其溶解性,该PT没有得到广泛的应用。1986年,Elsenbaumer等^[4]通过2,5-偶联PT的类似方法,合成了3-烷基噻吩。侧链烷基官能团的引入,使得PT结构具有灵活性,削弱了链间的 π -共轭作用,溶解性增加。此后,含有各种取代基的可溶性PT不断被合成,主要包括:烷基、烷氧基、苯环、六元环等,极大地丰富了PT衍生物的种类。PT也可分为阳离子和阴离子型:阳离子型主要包括季铵盐、吡啶盐和咪唑鎓盐等,阴离子型主要包括羧基、磺酸基和磷酸基取代基等。其中,阳离子PT在生物分析中的应用更为广泛,这可能是生物分子,如DNA、蛋白质等以阴离子形式存在,使得PT更易与分析物进行相互作用。

2 聚噻吩的传感机制

聚噻吩构象主要包括平面型、部分扭曲或螺旋状。平面构象的PT表现为吸收和荧光光谱红移,而扭曲构象的PT吸收和荧光光谱则表现为蓝移。PT还可通过堆积作用形成H-聚集体或J聚集体。因此,PT的光学特性取决于其聚集、构象规则性和骨架构象。这些因素受到PT与目标分析物或其适配体之间的氢键作用、静电等相互作用,诱导PT的骨架构象或聚集状态发生变化,或与分析底物之间发生FRET^[5,6],改变光谱性质。因此,PT在不同环境刺激下骨架构象的重排和聚集反应是影响光谱响应信号的光学传感的基本机制。这种“分子识别-构象响应-光学信号转化”的过程,与生物分析教学中的核心能力培养目标相对应—从分子水平理解检测原理,到宏观层面掌握光谱分析技术。

以先前合成的PT分子为例,通过紫外-可见吸收光谱测定其在不同溶剂的吸收光谱,帮助学生理解PT的构象变化。配置浓度为20mg/L的溶液,总体积为2mL,扫描吸收光谱范围为200-600nm,测定吸收光谱。结果如图1所示,PT吸收光谱具有溶剂化效应,在水中的吸收光谱相对乙醇、乙腈和乙醇溶液蓝移。根据上述结论,平面构象的PT吸收光谱红移,扭曲构象吸收光谱蓝移(图1)。因此,我们认为PT在水中以更加扭曲的构象存在。本实验设计注重科研思维训练,在大学生创新项目中引入前沿应用案例,与科研接轨。该分析方法在类品质控制(酒精度检测)、食品工业(溶剂残留监控)等领域具有重要应用价值。比如,利用乙醇和水中的构象差异,可以用于检测乙醇中的水含量,在食品分析、酒厂等具有重要作用。通过本实验,学生不仅能掌握紫外光谱分析技术,更能体会基础研究与实际应用间的转化逻辑,培养解决复杂分析问题的创新能力。

3 PT用于分析物的检测

共轭聚噻吩(PT)的教学应用价值体现在其独特的分子识别机制与信号放大特性。PT与目标分析物或其适配体之间的静电相互作用、氢键作用,诱导PT的构象或聚集状态发生变化,改变光谱性质。基于PT的光学特征用于化学传感,主要包括检测核酸、蛋白质、生物小分子等。

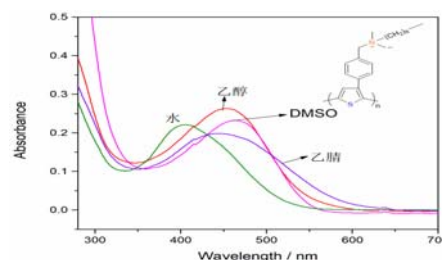


图1 PT在不同溶剂的吸收光谱图

3.1 核酸。核酸具有磷酸基团,使其带有净负电荷,核苷酸碱基之间形成氢键。可设计侧链末端带有正电荷功能基团的PT,通过与核苷酸的磷酸基团通过静电相互作用、氢键作用实现核苷酸的分析与检测。Ho等^[7]认为,PT与单链DNA和双链DNA有不同的静电相互作用,从而导致不同的构象变化。在55℃溶液中,聚(3-烷氧基-4-甲基噻吩)的最大吸收峰在短波长~400nm,溶液呈黄色,主要以卷曲形式存在。当溶液中加入1 equiv单链DNA序列后,吸收红移至527nm。该结果说明PT与单链DNA并不是孤立存在,而是形成一种双链结构。当1 equiv互补序列Y1加入后,形成PT1-X1-Y1三联体,溶液恢复黄色,吸收在420nm。这是因为PT-1由高度共轭的平面型向低共轭的非平面型构象转变。当Y1中的DNA序列与X1发生1-2个碱基错配时,吸收不再显示三联体态,而是~527nm的吸收下降。这项研究表明,双链和三链构型中PT构象的差异性是检测的基本原理,该方法可以轻松区分完全互补匹配和含有1-2个碱基对错配的寡聚核苷酸。

3.2 蛋白质和氨基酸。除核酸外,PT能够与适配体或人工核酸配体结合,以高特异性结合后识别蛋白质、氨基酸等。本小节介绍以PT作为光学传感器,适配体作为识别元件或直接将PT作为检测探针,构建蛋白质的光学检测方法。Ho和Leclerc等^[8]利用聚(3-烷氧基-4-甲基噻吩)和适配体(ssDNA)开发了一种用于检测人类 α -凝血酶的光学传感器,检出限达到飞摩尔级别。在含K⁺的溶液中,PT以卷曲形式存在,溶液呈现黄色,荧光发射峰525nm。当非特异性适配体或无 α -凝血酶加入溶液中,适配体保留其游离形式,并与PT通过静电作用形成双链,导致其形成更大共轭程度的PT,吸收和发射光谱红移,溶液转变为红紫色。当人凝血酶:特异性凝血酶DNA:PT的比例为1:1:1时,适配体在K⁺存在下形成稳定的G-四链体结构,使得PT以较为卷曲的构象存在,溶液呈橙色,且荧光强度下降。适配体的构象变化可通过PT的光学信号(比色法或荧光法)进行检测,而无需对适配体或人体 α 凝血酶进行任何标记。除利用PT与适配体的静电作用外,可设计基于非辐射能量转移(FRET)策略的蛋白检测方法。Berá Aberem等^[9]利用共价键将ssDNA-PT连接到改性玻璃载玻片表面。检测策略为PT(供体)与标记在ssDNA 3'端的荧光团Cy3-之间发生快速的FRET过程。当加入凝血酶时,可增强荧光信号,但加入其他非特异性蛋白,如牛血清蛋白(BSA),荧光仍很低。该方法特异性强,灵敏度高,检出限 6.2×10^{-11} M。

PT对氨基酸的识别机理与检测蛋白质类似。Yao等^[10]利用含

季铵盐阳离子的聚噻吩PMTPA实现了对半胱氨酸(Cys)和同型半胱氨酸(Hcy)的检测。Cys和Hcy异常含量与阿尔茨海默病、心血管疾病和生长缓慢等疾病有关,因此监测其含量至关重要。由于利用PT不易检测到氨基酸,该策略将2-氰基-6-甲基苯并噻唑(CBT)与氨基酸形成稳定的CBT-Cys或CBT-Hcy芳香族阴离子复合物。PMTPA在溶液中为无规卷曲构象,加入CBT-Cys或CBT-Hcy后,吸收红移并形成 $\pi-\pi$ 堆积的聚集体,导致PMTPA的吸收红移或荧光下降。

3.3生物小分子。PT用于生物小分子的检测主要包括磷酸腺苷、叶酸、抗生素和多糖等。检测策略主要是利用PT侧链易于修饰的特点,改变侧链功能化基团,与分析物产生特异性相互作用,以实现分析物的检测。核苷酸磷酸盐对各种生物反应和代谢过程至关重要。利用水溶性PT对不同磷酸基的核苷酸的结合能力的差异,Wang^[11]等将该PT用于葡萄糖磷酸化的实时在线可视化检测。Yao等^[12]利用不同核苷酸对聚(3-(4-甲基-3'-噻吩氧基)丙基三甲基铵(PMTPA))构象聚集影响的差异性。静电、亲水和疏水相互作用导致PMTPA骨架平面化,并形成具有不同分子排序的PMTPA聚集体,从而产生不同的光学响应。通过线性判别分析(LDA)实现了15种ATP类似物的识别与区分。近年来,研究者们将PT对ATP的检测应用于细胞、动物体水平,实时监测ATP水平^[13-15]。Lan等合成一种3-苯基取代的PT,侧链含有奎宁季铵盐手性分子,作为羧苄青霉素的识别基团。二者可通过静电作用,引起PT构象刚性化和聚集,导致荧光红移和下降。此外,Lan等合成3-苯环取代的季铵盐阳离子PT和DABCO基团取代的PT嵌段聚合物。苯环的刚性作用可以更大程度的调整PT的构象,促进信号放大;而DABCO基团的引入增强对脂多糖磷酸基团的强亲和力,实现了高灵敏的检测脂多糖。

4 结语

本研究通过系统分析共轭聚噻吩(PT)在生物分析检测中的技术特性与教学潜力,构建了其融入课程的创新路径。PT的 π -共轭结构与环境响应特性,为教学提供独特优势,既可以使学理解荧光生物分析原理,又可助力学生掌握性能优化方法。尽管目前PT在生物相容性与特异性识别方面仍存在技术挑战,但这些科学问题恰恰构成了教学中的“探究点”——引导学生分析在实验中分析问题根源、设计解决方案,培养批判性思维与科研素养。

[基金项目]

华北理工大学大学生创新创业项目(X2024206)。

[参考文献]

- [1]Ho H A, Najari A, Leclerc M. Optical detection of DNA and proteins with cationic polythiophenes [J]. Acc. Chem. Res., 2008,41(2):168-178.
- [2]Yamamoto T, Sanechika K, Yamamoto A. Preparation of thermostable and electric-conducting poly(2,5-thienylene) [J]. J. Polym. Sci., Part C: Polym. Lett., 1980,18(1):9-12.
- [3]Shu X, Li X, Xia J B. Synthetic Methods for Poly(thiophene)s [J]. Progress in Chemistry, 2015,27(4):385-394.

ne)s [J]. Progress in Chemistry, 2015,27(4):385-394.

- [4]Elsenbaumer R L, Jen K Y, Oboodi R. Processible and environmentally stable conducting polymers [J]. Synth. Met., 1986,15(2-3):169-174.
- [5]Ho H A, Dore K, Boissinot M, et al. Direct molecular detection of nucleic acids by fluorescence signal amplification [J]. J. Am. Chem. Soc., 2005,127(36):12673-12676.
- [6]Kell A J, Page L, Tan S, et al. The development of a silica nanoparticle-based label-free DNA biosensor [J]. Nanoscale, 2011,3(9):3747-3754.
- [7]Ho H A, Boissinot M, Bergeron M G, et al. Colorimetric and fluorometric detection of nucleic acids using cationic polythiophene derivatives [J]. Angew. Chem., Int. Ed., 2002,41(9):1548-1551.
- [8]Ho H A, Leclerc M. Optical sensors based on hybrid aptamer/conjugated polymer complexes [J]. Journal of the American Chemical Society, 2004,126(5):1384-1387.
- [9]Abérem M B, Najari A, Ho H A, et al. Protein detecting arrays based on cationic polythiophene-DNA-aptamer complexes [J]. Advanced Materials, 2006,18(20):2703.
- [10]Yao Z Y, Bai H, Li C, et al. Colorimetric and fluorescent dual probe based on a polythiophene derivative for the detection of cysteine and homocysteine [J]. Chemical Communications, 2011,47(26):7431-7433.
- [11]Tang Y L, Teng F, Yu M H, et al. Direct visualization of glucose phosphorylation with a cationic polythiophene [J]. Advanced Materials, 2008,20(4):703.
- [12]Yao Z Y, Feng X L, Hong W J, et al. A simple approach for the discrimination of nucleotides based on a water-soluble polythiophene derivative [J]. Chem. Commun., 2009,(31):4696-4698.
- [13]Huang B H, Geng Z R, Ma X Y, et al. Lysosomal ATP imaging in living cells by a water-soluble cationic polythiophene derivative [J]. Biosensors & Bioelectronics, 2016,83:213-220.
- [14]Geng Z R, Zhang M M, Huang B H, et al. A novel nanoparticle fluorescent probe based on a water-soluble conjugated polymer for real-time monitoring of ATP fluctuation and configuration of the Golgi apparatus during the inhibition of glycolysis [J]. Analytica Chimica Acta, 2024,1304.
- [15]Liu C, Zhang Q, An N Q, et al. A new water-soluble polythiophene derivative as a probe for real-time monitoring of adenosine 5'-triphosphatase activity in lysosome of living cells [J]. Talanta, 2018,182:396-404.

作者简介:

郎云贺(1993--),女,汉族,河北保定人,博士,讲师,主要从事荧光探针在生物分析的研究。