刺激-响应型蛋白质分子印迹材料的研究进展

乔娟^{1,2}, 齐莉^{1,2*}

1. 中国科学院化学研究所, 活体分析化学国家重点实验室, 北京分子科学国家研究中心, 北京 100190;

2. 中国科学院大学化学科学学院, 北京 100049

* 联系人, E-mail: qili@iccas.ac.cn

2018-09-05 收稿, 2018-09-20 修回, 2018-09-25 接受, 2018-10-31 网络版发表

国家自然科学基金(21575144, 21874138, 917321032, 1727809, 21635008, 21621062)和中国科学院前沿科学重点研究项目(QYZDJ-SSW-SLH034)资助

摘要 蛋白质分子印迹技术在蛋白组学、生命科学、生物传感、药学研究及生物样品纯化等领域具有广泛的应用价值并备受关注. 不过, 由于其分子量较大, 蛋白质分子印迹材料在应用中还存在蛋白质的传输扩散效率较低及吸附脱附较难等缺陷. 而新出现的刺激-响应型蛋白质分子印迹材料可对外界刺激做出反应, 并可进一步通过调控分子印迹材料与生物大分子之间的相互作用来实现目标蛋白质的高效快速捕获及释放, 因此其具有重要的应用前景. 本文综述了近20年来刺激-响应型蛋白质分子印迹材料的研究进展, 并概述了其制备方法、聚合物单体种类、刺激-响应类型及机理, 还进一步阐明了刺激-响应型蛋白质分子印迹技术的未来发展方向.

关键词 刺激-响应型聚合物, 分子印迹材料, 蛋白质捕获/释放

分子印迹(MIP)是制备对特定目标分子具有特异识别功能的一种技术. 制备分子印迹材料时, 通常将模板分子与功能单体、交联剂、致孔剂等聚合物溶液中进行聚合, 制备得到固体介质. 然后, 再通过物理或者化学方法洗脱除去固体介质中的模板分子, 得到“印迹”有目标模板分子的空间结构和结合位点的空穴^[1,2]. 当此MIP材料与溶液中目标分子作用时, 可以通过氢键、疏水作用、静电作用等多种相互作用来实现目标分子的选择性捕获和释放. 这种方法的优势是基于自然界“钥匙”与“锁”的原理, 可以对某一特定分子具有空间结构的选择性识别能力. 近年来, MIP技术已应用于生命科学及生物分析^[3,4]等研究领域. 特别值得一提的是, 相对于抗体识别的捕获方法^[5,6], 这种基于MIP技术的选择性捕获和释放蛋白质的方法(图1)具有价格低廉、性能稳定和可重复使用的优势.

图1 (网络版彩色)蛋白质分子印迹、捕获与释放机理示意图

Figure 1 (Color online) Representation of protein imprinting process and target protein capture/release mechanism

众所周知, 小分子的MIP技术已日臻成熟并且应用广泛^[7,8], 但迄今为止, MIP技术在生物大分子尤其是蛋白质分子的应用却相对较少, 因此, 制备对特定

引用格式: 乔娟, 齐莉. 刺激-响应型蛋白质分子印迹材料的研究进展. 科学通报, 2019, 64: 1330–1339

Qiao J, Qi L. Progress of stimuli-responsive molecular imprinted materials for capture/release of proteins (in Chinese). Chin Sci Bull, 2019, 64: 1330–1339, doi: 10.1360/N972018-00919

目标蛋白质分子具有特异识别功能的MIP材料仍然是极具挑战性的研究课题。这主要是由于蛋白质的分子量较大、结构复杂且具有构象易变等特性,因而导致目前的蛋白质MIP技术存在如下瑕疵:一方面,蛋白质分子量及体积较大,进出MIP结合位点不易,而蛋白质传输扩散效率的降低会导致印迹效率较低;另一方面,采用MIP技术从复杂的生物样品中捕获目标蛋白质后,需保持蛋白质的原有特性来开展进一步研究。这就要求被MIP捕获的蛋白质能在温和的洗脱条件下快速脱附,但传统体相MIP制备方法对蛋白质的吸附较慢,且需要在苛刻的高盐或高温条件下进行目标蛋白质的脱附。这些不足之处极大地制约了蛋白质MIP方法的应用,因此,为了解决蛋白质MIP技术中存在的瓶颈问题,研究者将传统的体相MIP制备方法发展为表面MIP方法。同时,多种具有刺激-响应性质的蛋白质MIP材料也逐渐被研发出来,其中包括温敏、pH敏及光敏等MIP材料。近年已有研究者总结了蛋白质MIP的方法和应用,但却鲜有着重介绍刺激-响应型蛋白质MIP材料的综合性报道。此外,虽然美国Sigma-Aldrich公司已推出了商品化的MIP材料(SupelMIP),并用于富集生物体液样品中的 β -激动剂(如:溴布特罗、克伦特罗、福莫特罗等)残留,但迄今尚未见到刺激-响应型蛋白质MIP材料的商品化产品。由于使用者需依据目标蛋白质与聚合物的特性来设计制备这类刺激-响应型蛋白质MIP材料,因此,对蛋白质MIP材料个性化制备技术上的高要求在一定程度上阻碍了其商品化的发展进程。为了更好地总结该领域的研究成果及推广该技术,本文综述了近20年文献所报道的具有刺激-响应特性的蛋白质MIP材料的机理、制备方法、聚合物单体种类及其应用。

1 蛋白质MIP材料制备方法

根据分子印迹聚合物的制备方法,可以分为本体聚合法、悬浮聚合法^[9,10]、乳液聚合法^[11]、沉淀聚合法及表面印迹法^[12]等。这些方法已被广泛应用于小分子的MIP材料的制备中,理论上也可用于刺激-响应型蛋白质MIP材料的制备。

1.1 本体聚合法

本体聚合法多用来制备块状的MIP材料,合成时只需加入少量溶剂作为致孔剂,所制备的MIP材料具

有良好的吸附选择性,且制备过程简单。但是,这种方法却存在着如下缺点:块状的MIP材料在使用前需要经过粉碎、研磨等过程。因此,MIP材料内部的模板分子较难去除并会降低印迹分子的吸附效率,进一步会影响MIP材料的吸附容量。近年出现的活性/可控自由基聚合策略被用于MIP本体聚合中,所制备的MIP材料其性能更加优越。Haupt课题组^[13]采用可逆加成-断裂链转移本体聚合法(RAFT)并通过调控聚合物的交联度,成功制备了比自由基聚合法性能更优的MIP新材料。

1.2 悬浮聚合法

悬浮聚合法采用水为连续相,将引发剂、反应单体和稳定剂高速搅拌形成悬浮液滴,实现液滴内的聚合,最终获得球形MIPs材料。但此法在制备过程中以水作为连续相会影响模板分子与单体之间的非共价键作用,会进一步导致球形MIPs材料对模板分子识别能力的降低。Yan课题组^[14]采用悬浮聚合法制备得到了表面亲水的MIP材料并将其应用于鸡蛋清样品的固相萃取研究中。

1.3 乳液聚合法

乳液聚合法通常用于制备球形MIP材料。合成时通常将模板分子、功能单体、交联剂等溶解于有机溶剂,在水中加入乳化剂/表面活性剂,二者混合搅拌、乳化,进行引发聚合。Tan和Tong^[11]采用甲基丙烯酸(MAA)、二甲基丙烯酸乙二醇酯(EGDMA)等功能单体和表面活性剂作为油相,将模板蛋白分散于该溶液中,与磁性四氧化三铁纳米颗粒混合,制备成乳液,进而引发聚合得到了分子印迹材料。这种聚合法由于加入了表面活性剂,使得印迹分子的去除,特别是目标蛋白质分子的纯化变得很困难,因此限制了该方法在蛋白质分子MIP中的应用。

1.4 沉淀聚合法

采用沉淀聚合法可制备得到分散均匀的MIP小球材料,且在聚合过程中不需加入稳定剂等反应物,有利于印迹分子的去除及目标分子的纯化。不过,沉淀聚合法需要进行致孔剂及单体比例的优化,以便获得理想的MIP材料。Carter和Rimmer^[15]采用沉淀聚合法制备得到了具有较均匀网络结构的MIP微球,发现所制备的MIP材料的印迹效果显著且吸附性能良好。

1.5 表面印迹法

表面印迹法是指在基质材料的表面接枝MIP材料. 这种方法的优势在于: 分子印迹层较薄, 易于实现模板分子的去除及捕获, 传质效率及吸附容量高, 可在二氧化硅球^[16]、磁性 Fe_3O_4 纳米颗粒^[17]、量子点^[18]、碳纳米管^[19]、薄膜^[20]等基质材料的表面印迹接枝MIP材料. Choong等人^[19]在碳纳米管表面键合了聚吡咯涂层, 发现相较于非表面印迹的碳纳米管材料, 所制备的表面印迹MIP新材料的印迹效率提高了3.6倍. 本课题组^[21]在磁性 Fe_3O_4 纳米颗粒表面先修饰了含双键的硅烷偶联剂, 再将单体、蛋白质模板分子、引发剂及交联剂混合, 采用自由基聚合法制备得到了包埋模板蛋白质分子的表面印迹材料, 进而实现了溶菌酶的可控高效捕获及释放.

1.6 其他MIP材料制备方法

除了上述方法以外(表1), 一些自组装方法及溶胀聚合法等也被用于MIP材料的制备中. 这些方法各有优缺点, 可依据所选用的单体及模板分子的性质来选择合适的制备方法.

2 制备蛋白质MIP材料的单体、引发剂及交联剂

制备蛋白质MIP材料时, 单体将提供与模板分子共价键合或者非共价键合的功能基团, 一些常用的单体结构式如图2所示. 单体与模板分子之间的相互作用会影响MIP材料的选择性及吸附能力, 而且, 功能单体与模板分子之间的摩尔比例也会影响MIP材料的吸附效率: 低摩尔比会导致较低的吸附效率, 提高摩尔比可提高吸附效率, 但同时也会增加非特异性吸附的比率.

影响蛋白质MIP材料吸附效率的另一重要因素是交联剂的选择及用量. 交联剂可固定单体上的功能基团, 控制其与模板分子之间的作用. 适当的交联度可为模板分子印迹提供刚性的结构, 有利于捕获目标分子. 特别值得一提的是, 交联剂的使用可保持MIP材料空腔的立体结构, 为印迹分子尤其是蛋白质的捕获提供必要的三维空间. 常用的交联剂有乙二醇二甲基丙烯酸酯(ethylene glycol dimethacrylate, EGDMA)、二乙烯基苯(divinylbenzene, DVB)、三羟甲基丙烷三甲基丙烯酸酯(trimethylolpropane trimethacrylate, TTT)及 N,N' -甲基烯基二丙烯酰胺(N,N' -methylenebisacrylamide, MBAA)等(图2).

蛋白质MIP材料制备中, 依据聚合方法的不同, 聚合反应的引发剂可分为有机小分子化合物和水溶性无机化合物. 常用的有 N,N,N',N' -四甲基二胺(N,N,N',N' -tetramethylenediamine, TEMED)、2,2'-偶氮二异丁腈(2,2'-azobisisobutyronitrile, AIBN)和一些有机过氧化物(如过硫酸铵、过硫酸钾、过氧化苯甲酰及过氧化双十二酰等).

另外, 制备中所使用的致孔剂种类及用量亦会影响蛋白质MIP材料的孔隙率、孔结构及吸附效率. 甲苯、乙腈及氯仿等低极性溶剂常被用于非共价键合, 以此来稳定氢键及减少模板分子-单体之间的干扰. 但是, 在有机相中制备的MIP材料在水相中使用时, 其印迹效果较差, 因此, 构建基于水相中聚合的MIP材料是实现高效蛋白质分子印迹及捕获的有效途径.

3 刺激-响应型蛋白质MIP材料

刺激-响应型聚合物是一类能对特殊的外界刺激^[34](如温度、磁场、pH及光照等刺激)产生响应的高性能材料^[35]. 其优势如下: 可智能响应来自于环境

表1 蛋白质MIP材料制备方法总揽

Table 1 Overview of the preparation methods of protein MIP materials

制备方法	优点	缺点	文献
本体聚合	致孔剂使用量较少、块状产物、操作简单、选择识别性好	交联度高、模板不易去除、块状材料需研磨为颗粒、研磨易损失识别位点	[22~25]
悬浮聚合	聚合温度易控制、可调节球形MIP粒径	球形材料粒径分布较宽、表面活性剂/稳定剂影响印迹效果削弱模板与单体间非共价键作用	[14]
乳液聚合	球形MIP材料、粒径均匀	使用表面活性剂、产物纯化较难	[11]
沉淀聚合	无稳定剂、微球颗粒均匀	使用大量致孔剂、影响MIP小球形态和粒径	[26]
表面印迹	分子印迹层薄、模板分子易捕获/释放	吸附容量受限、需在不同材质表面引发聚合	[21,27~33]

图2 制备蛋白质MIP材料常用的单体及交联剂结构示意图

Figure 2 Chemical structures of common functional monomers and cross linking agents for fabrication of protein MIP materials

的刺激,实现模板分子的可控洗脱及目标分子的可控捕获/释放;洗脱条件较温和,有利于保持蛋白质的结构及特性不受捕获/洗脱条件影响,可为后续的蛋白质结构分析研究提供基础^[36]。近年来,这类具有刺激-响应特性的MIP材料已获得人们的青睐并用于目标蛋白质的捕获/释放研究中。对各类刺激-响应型蛋白质MIP材料的制备方法及其优缺点进行了汇总(表1),各种材料所用的单体、基质及实际样品的应用均列于表S1中。

刺激-响应型MIP材料通常是将刺激-响应单体共聚到聚合物中,其捕获或释放目标分子的性能可依据外界刺激进行调控。因MIP材料对各种刺激的响应性能不同,因此,所选用的功能单体及设计思路也不尽相同。

3.1 温度刺激-响应型蛋白质MIP材料

温敏聚合物能实现对环境温度变化的可控响应,并会随之改变其聚合物的结构,其特性通常是由聚合物网络中亲水基团和疏水基团之间相互变化产生的。这类温敏聚合物具有特定的相转变温度(LCST),当环

境温度发生变化时,温敏聚合物链在水溶液中会出现收缩/伸展的形貌变化,并进一步产生亲疏特性变化。

常见的用于制备温敏蛋白质MIP材料的单体种类如图3所示。异丙基丙烯酰胺(NIPAM)类化合物是最常用的温敏单体,它们分别包含亲水基团和疏水基团。而聚异丙基丙烯酰胺(PNIPAM)是典型的温度刺激-响应型聚合物,以其制备温敏蛋白质MIP材料的途径有如下两类:以PNIPAM作为温敏功能单体或者利用PNIPAM本身的温敏特性来实现对蛋白质MIP材料的温敏控制。这类材料对目标蛋白质的捕获/释放机理为:当环境温度低于其LCST时,温敏聚合物链上的亲水基团会与水分子形成氢键,此时,温敏聚合物链伸展、亲水并可溶;当环境温度高于其LCST时,氢键被破坏,温敏聚合物链卷曲塌陷,并呈疏水不溶状。

1998年,Watanabe等人^[35]首次采用本体聚合法制备了具有温度刺激-响应特性的MIP材料,并将其用于对模板分子的特异性捕获识别研究中。随后,基于温敏MIP材料对目标蛋白质的捕获/释放的条件温和且操作简便,国内外一些研究小组从不同侧面陆续报道了一系列温度刺激-响应型蛋白质MIP材料的制备及

图3 温度刺激-响应型单体

Figure 3 Chemical structures of common thermal-responsive monomers

应用方面的研究工作^[22-24,26-30,37-40],包括水凝胶材质^[38]、癌症标志物的捕获^[23]及温度-刺激响应的机理研究^[24]等。此外,研究者还详细考察了温敏单体种类、双门控及环境温度等因素对MIP材料制备的影响。2008年,Zhao课题组^[24]采用本体聚合法,以PNIPAM作为温度响应单元,考察了所制备的MIP材料的温度及盐浓度的双响应性能,通过调控这2个重要参数来控制MIP材料印迹空穴的尺寸大小,进而实现了对溶菌酶和细胞色素C的快速捕获和释放。2015年,Li等人^[40]选取丙烯酰胺类温敏单体并结合甲基丙烯酸羟乙酯(2-hydroxyethyl methacrylate, HEMA)单体,采用表面印迹法制备了温度响应范围在25~37℃的温敏蛋白质MIP材料,并将其用于目标蛋白质的识别和捕获。Zhang等人^[28,39]分别于2009年及2016年采用本体聚合法及表面印迹法,以N-异丙基丙烯酰胺作为温度响应单体,结合乙烯基苯基亚氨基二乙酸(vinylbenzyl iminodiacetic acid, VBIDA)与铜离子及模板蛋白质之间的络合作用,成功制备了基于PNIPAM的温敏蛋白质MIP材料。研究发现,所制备的温敏MIP材料在28~43℃可有效调控目标蛋白的捕获和释放。与此同时,本课题组^[21,29,30]基于铜离子与蛋白质的相互作用,以2-甲基-2-丙烯酸-2-(2-甲氧基乙氧基)乙酯(MEO₂MA)为主结构单体,以VBIDA和MAA为辅助单体,以MBAA为交联剂,以溶菌酶为模板,采用表面印迹法,制备了系列基于寡聚乙二醇类温敏聚合物^[29]的MIP磁性纳米颗粒。该MIP材料表现出了良好的选择性、较高的吸附容量及快速的吸附速率,对溶菌酶的亲和性可通过环境温度的改变来

进行调节,可避免传统MIP方法中苛刻的洗脱需求。通过改变聚合物的分子量及链长等可调控MIP材料的温敏性,并成功实现了对人尿样品中溶菌酶-在5~25℃的可控释放及捕获(图4)^[29]。

3.2 pH刺激-响应型蛋白质MIP材料

pH敏蛋白质MIP材料通常包含易于质子化的基团(质子供体或受体),如羧基、氨基等。人们通常将pH响应单体(多聚赖氨酸、丙烯酸等)与功能单体结合来制备蛋白质MIP材料。这类材料对环境pH的刺激-响应机理如图5所示,即当环境pH改变时,MIP材料内部已形成的氢键被破坏,而MIP材料结构发生的变化会引起印迹位点的结构或体积的变化,进而可实现对目标蛋白质的响应性识别。2010年,Zhao课题组^[25]选择性能优越的4-乙烯基吡啶(4-vinylpyridine)单体,采用本体聚合法制备了pH响应的MIP新材料,以其作为辣根过氧化物酶的模拟酶,通过pH的改变来调控MIP新材料与目标分子之间的相互作用,并展示了其在蛋白质MIP材料中的应用潜力^[41,42]。2013年,Li课题组^[43]采用本体聚合法,制备了基于硼酸的蛋白质MIP材料,利用硼酸与糖蛋白之间的亲和相互作用,显著提高了模板蛋白质的印迹效率,进而利用硼酸的pH刺激-响应特性实现了对目标糖蛋白的可控捕获/释放。

3.3 光刺激-响应型蛋白质MIP材料

光敏MIP材料具有响应速度快、易控和可逆等优点,但光敏蛋白质MIP材料的研究工作报道的较少。近年来,人们尝试着将具有光刺激-响应性能的单体与功能基团结合来制备具有光敏特性的蛋白质MIP材料。2015年,Wang课题组^[31]将聚多巴胺涂覆于多孔

图4 (网络版彩色)温度刺激-响应型MIP材料对目标蛋白质捕获/释放机理示意图^[29]Figure 4 (Color online) Capture/release mechanism of target proteins using the thermal-responsive MIP materials^[29]. Copyright © 2014 American Chemical Society

图5 (网络版彩色)pH刺激-响应型蛋白质MIP材料对目标蛋白质捕获/释放机理示意图

Figure 5 (Color online) Principle of capture/release of target proteins using pH-responsive MIP materials

基质表面, 采用表面印迹法制备了新型光刺激-响应型蛋白质MIP材料. 采用近红外光(NIR)来照射此光敏MIP材料时, 聚多巴胺涂层发生了形貌变化, 进而实现了目标蛋白质-溶菌酶-的可控捕获及释放(图6).

目前文献[44~46]所报道的紫外(UV)光刺激-响应单体主要为含有偶氮苯生色团的功能单体(图7). 当UV光照射到偶氮苯生色团时, 会发生光照异构化, 进而导致印迹孔穴中的作用位点发生变化, 以此来实现对模板分子的光照可控捕获/释放. 为了实现偶氮苯生色团的功能单体的共聚, 一般需要在偶氮苯生色团上修饰双键基团或设计合成具有类似功能基团的偶氮苯功能单体. 虽然这类UV光敏MIP材料目前只能应用于对小分子的捕获/释放, 但此类MIP材料的诸多优势使其有望在未来应用于生物大分子及蛋白质分子的光敏可控捕获/释放研究中.

3.4 双/多重响应的蛋白质MIP材料

在建立了上述刺激-响应型蛋白质MIP材料的基

础上, 研究人员又尝试着将双重响应或多重响应的单体整合在一种MIP材料中, 以期实现对目标蛋白质的双/多重响应控制捕获及释放. 较常见的双重响应蛋白质MIP材料包括: 温度/光刺激-响应材料^[40]、温度/pH刺激-响应材料^[38,42,43]及温度/磁场刺激-响应材料^[21,29]. 人们还进一步将其应用于标准蛋白质, 如牛血清白蛋白^[38]或卵清蛋白^[43]的捕获及释放研究. 具体的实施方案主要基于将不同性能的单体共聚于MIP材料中, 并采用多参数来调控蛋白质的捕获及释放, 其优势是选择性更佳, 释放及捕获的速率亦可由多重参数调控. 但是, 一方面, 由于温度/磁场双重刺激-响应的蛋白质MIP材料中的磁响应主要用于将MIP材料从溶液中分离而非用于蛋白的表面印迹; 另一方面, 由于双/多重响应的蛋白质MIP材料在制作过程中需要在同一体系中引入多种响应单体, 聚合条件及蛋白质MIP材料的最佳性能的获得需要进行多次优化, 增加了MIP材料的制备难度. 因此, 双/

图6 (网络版彩色)光刺激-响应型蛋白质MIP材料对目标蛋白质捕获/释放机理示意图

Figure 6 (Color online) Photo-responsive MIP materials for capture/release of target proteins

图7 含有偶氮苯生色团的光响应功能单体

Figure 7 Chemical structures of common photo-responsive monomers

多重刺激-响应型蛋白质MIP材料的进一步发展也面临着诸多难题,需要研究人员付出更多的努力来开发制备操作更简单、性能更优异的双/多重刺激-响应蛋白质MIP材料.

3.5 其他蛋白质MIP材料

基于硼亲和作用的蛋白质MIP材料通常包含硼酸基团.人们通常先将模板分子固定到硼酸功能化的基质上,然后,利用生物相容性良好的功能单体在基质表面聚合,形成合适厚度的印迹层以及与模板分子空间匹配的印迹腔.基于硼亲和作用的MIP方法克服了传统印迹方法中难以同时印迹大小不同的生物分子及更难以对印迹过程进行精确控制的难题,可便捷高效地制备出特异性识别糖蛋白、聚糖和单糖的MIP材料(图8).Liu课题组^[32,33,47,48]采用表面印迹法,在2014~2017年间报道了一系列基于硼亲和作用的糖蛋白MIP材料,并实现了对目标卵清白蛋白的高效可控捕获/释放.Liu课题组^[49]还发展了基于硼亲和作用可控定向表面印迹法,制备了含有模板分子印迹腔的表面MIP材料,由于在基质表面已预先键合了硼酸功能化基团,所制备的MIP材料可实现对糖蛋白、聚糖和单糖的特异性捕获与识别.硼亲和MIP材料目前已在疾病诊断、癌细胞靶向识别和活体单细胞分析等重要应用领域中展现出了其优越的分子识别性能^[32,33,49].

4 展望

刺激-响应调控蛋白质MIP材料具有突出的物化特性,由于其结合了识别和响应两大功能,可采用温和、可控的条件来实现对目标蛋白质的捕获及释放,这类材料已经引起了人们越来越大的兴趣.经过20

图8 (网络版彩色)硼亲和MIP材料对目标糖蛋白的捕获/释放机理示意图

Figure 8 (Color online) Boron affinity MIP materials for capture/release of glycoproteins

年的发展,人们已经制备出了许多性能优异的刺激-响应调控蛋白质MIP材料,并将其应用于疾病诊断、靶向识别及生物传感等研究领域.但是,刺激-响应调控蛋白质MIP材料相关的基础科学与实际应用方面的问题依然存在.(1) 基于刺激-响应识别机理的蛋白质MIP理论研究相对较少,从热力学、动力学角度及从分子水平理解蛋白质的刺激-响应及识别过程还缺乏系统研究;(2) 刺激-响应单体、交联剂、功能单体的用量及聚合方法对于刺激-响应型蛋白质MIP材料的性能影响较大,需经繁杂的优化过程,MIP材料的制备亦缺少系统的理论指导;(3) 迄今所用的模板分子多为标准蛋白质(溶菌酶、卵清白蛋白等),而以与疾病诊疗相关的生物标志物为模板分子来制备刺激-响应型蛋白质MIP材料的研究较少,限制了其临床实用;(4) MIP材料,尤其是针对蛋白质捕获/释放的刺激-响应型材料目前尚无商品化的产品.美国Sigma-Aldrich公司推出的MIP材料(SupelMIP)也仅能富集样品中的小分子药物残留.究其原因主要是刺激-响应型蛋白质MIP材料的制备复杂且具有特异性,因此,未来的发展趋势仍然以开发具有高新性能的刺激-响应型蛋白质MIP材料为主,以实现其市场化为辅.

参考文献

- Zaidi S A. Latest trends in molecular imprinted polymer based drug delivery systems. *RSC Adv*, 2016, 6: 88807–88819
- Chen L X, Wang X Y, Lu W H, et al. Molecular imprinting: Perspectives and applications. *Chem Soc Rev*, 2016, 45: 2137–2211
- Haupt K, Mosbach K. Molecularly imprinted polymers and their use in biomimetic sensors. *Chem Rev*, 2000, 100: 2495–2504
- Hirayama K, Sakai Y, Kameoka K, et al. Preparation of a sensor device with specific recognition sites for acetaldehyde by molecular imprinting technique. *Sens Actuators B*, 2002, 86: 20–25
- Lavignac N, Allender C J, Brain K R. Current status of molecularly imprinted polymers as alternatives to antibodies in sorbent assays. *Anal Chim Acta*, 2004, 510: 139–145
- Ye L, Mosbach K. Molecularly imprinted microspheres antibody binding mimics. *React Funct Polym*, 2001, 48: 149–157
- Inoue Y, Kuwahara A, Ohmori K, et al. Fluorescent molecularly imprinted polymer thin films for specific protein detection prepared with dansyl ethylenediamine-conjugated O-acryloyl L-hydroxyproline. *Biosens Bioelectron*, 2013, 48: 113–119

- 8 Chen W, Ma Y, Pan J M, et al. Molecularly imprinted polymers with stimuli-responsive affinity: Progress and perspectives. *Polymers*, 2015, 7: 1689–1715
- 9 Jing T, Gao X, Wang P, et al. Determination of trace tetracycline antibiotics in foodstuffs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry coupled with selective molecular-imprinted solid-phase extraction. *Anal Bioanal Chem*, 2009, 393: 2009–2018
- 10 Pérez-Moral N, Mayes A G. Novel MIP formats. *Bioseparation*, 2001, 10: 287–299
- 11 Tan C J, Tong Y W. Preparation of superparamagnetic ribonuclease a surface-imprint particles for protein recognition in aqueous media. *Anal Chem*, 2007, 79: 299–306
- 12 Pan G, Zhang Y, Guo X, et al. An efficient approach to obtaining water-compatible and stimuli-responsive molecularly imprinted polymers by the facile surface-grafting of functional polymer brushes via RAFT polymerization. *Biosens Bioelectron*, 2010, 26: 976–982
- 13 Gonzato C, Pasetto P, Bedoui F, et al. On the effect of using RAFT and FRP for the bulk synthesis of acrylic and methacrylic molecularly imprinted polymers. *Polym Chem*, 2014, 5: 1313–1322
- 14 Liu S, Yan H, Wang M, et al. Water-compatible molecularly imprinted microspheres in pipette tip solid-phase extraction for simultaneous determination of five fluoroquinolones in eggs. *J Agr Food Chem*, 2013, 61: 11974–11980
- 15 Carter S R, Rimmer S. Molecular recognition of caffeine by shell molecular imprinted core-shell polymer particles in aqueous media. *Adv Mater*, 2002, 14: 667–670
- 16 Haginaka J. Molecularly imprinted polymers as affinity-based separation media for sample preparation. *J Sep Sci*, 2009, 32: 1548–1565
- 17 Li Y, Dong C, Chu J, et al. Surface molecular imprinting onto fluorescein-coated magnetic nanoparticles via reversible addition fragmentation chain transfer polymerization: A facile three-in-one system for recognition and separation of endocrine disrupting chemicals. *Nanoscale*, 2011, 3: 280–287
- 18 Wu P, He Y, Wang H F. Conjugation of glucose oxidase onto Mn-doped ZnS quantum dots for phosphorescent sensing of glucose in biological fluids. *Anal Chem*, 2010, 82: 1427–1433
- 19 Choong C L, Bendall J S, Milne W I. Carbon nanotube array: A new MIP platform. *Biosens Bioelectron*, 2009, 25: 652–656
- 20 Yoshikawa M, Tharpa K, Dima S O. Molecularly imprinted membranes: Past, present, and future. *Chem Rev*, 2016, 116: 11500–11528
- 21 Ji S L, Li N, Shen Y, et al. Poly(amino acid)-based thermoresponsive molecularly imprinted magnetic nanoparticles for specific recognition and release of lysozyme. *Anal Chim Acta*, 2016, 909: 60–66
- 22 Ran D, Wang Y, Jia X, et al. Bovine serum albumin recognition via thermosensitive molecular imprinted macroporous hydrogels prepared at two different temperatures. *Anal Chim Acta*, 2012, 723: 45–53
- 23 Miyata T, Jige M, Nakaminami T, et al. Tumor marker-responsive behavior of gels prepared by biomolecular imprinting. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 1190–1193
- 24 Chen Z Y, Hua Z D, Xu L, et al. Protein-responsive imprinted polymers with specific shrinking and rebinding. *J Mol Recognit*, 2008, 21: 71–77
- 25 Chen Z Y, Xu L, Liang Y, et al. pH-sensitive water-soluble nanospheric imprinted hydrogels prepared as horseradish peroxidase mimetic enzymes. *Adv Mater*, 2010, 22: 1488–1492
- 26 Pan G, Guo Q, Cao C, et al. Thermo-responsive molecularly imprinted nanogels for specific recognition and controlled release of proteins. *Soft Matter* 2013, 9: 3840–3850
- 27 Qin L, He X W, Yuan X, et al. Molecularly imprinted beads with double thermosensitive gates for selective recognition of proteins. *Anal Bioanal Chem*, 2011, 399: 3375–3385
- 28 Li S W, Yang K G, Deng N, et al. Thermoresponsive epitope surface-imprinted nanoparticles for specific capture and release of target protein from human plasma. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2016, 8: 5747–5751
- 29 Li N, Qi L, Shen Y, et al. Novel oligo(ethylene glycol)-based molecularly imprinted magnetic nanoparticles for thermally modulated capture and release of lysozyme. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2014, 6: 17289–17295
- 30 Zhang M M, Qiao J, Qi L. Dual-functional polymer-modified magnetic nanoparticles for isolation of lysozyme. *Anal Chim Acta*, 2018, 1035: 70–76
- 31 Chen J X, Lei S, Xie Y Y, et al. Fabrication of high-performance magnetic lysozyme-imprinted microsphere and its NIR-responsive controlled release property. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2015, 7: 28606–28615
- 32 Bi X D, Liu Z. Enzyme activity assay of glycoprotein enzymes based on a boronate affinity molecularly imprinted 96-well microplate. *Anal Chem*, 2014, 86: 12382–12389
- 33 Tu X Y, Muhammad P, Liu J, et al. Molecularly imprinted polymer-based plasmonic immunosandwich assay for fast and ultrasensitive determination of trace glycoproteins in complex samples. *Anal Chem*, 2016, 88: 12363–12370
- 34 Mai B, Fernandes S, Balakrishnan P B, et al. Nanosystems based on magnetic nanoparticles and thermo- or pH-responsive polymers: An update and future perspectives. *Acc Chem Res*, 2018, 51: 999–1013

- 35 Watanabe M, Akahoshi T, Tabata Y, et al. Molecular specific swelling change of hydrogels in accordance with the concentration of guest molecules. *J Am Chem Soc*, 1998, 120: 5577–5578
- 36 Xu S F, Lu H Z, Zheng X W, et al. Stimuli-responsive molecularly imprinted polymers: Versatile functional materials. *J Mater Chem C*, 2013, 1: 4406–4422
- 37 Qin L, He X W, Jia M, et al. A thermosensitive monolithic column as an artificial antibody for the on-line selective separation of the protein. *Chem Eur J*, 2011, 17: 1696–1704
- 38 Demirel G, Özçetin G, Turan E, et al. pH/Temperature-sensitive imprinted ionic poly(*N*-tert-butylacrylamide-*co*-acrylamide/maleic acid) hydrogels for bovine serum albumin. *Macromol Biosci*, 2005, 5: 1032–1037
- 39 Qin L, He X W, Zhang W, et al. Macroporous thermosensitive imprinted hydrogel for recognition of protein by metal coordinate interaction. *Anal Chem*, 2009, 81: 7206–7216
- 40 Li C X, Ma Y, Niu H, et al. Hydrophilic hollow molecularly imprinted polymer microparticles with photo- and thermoresponsive template binding and release properties in aqueous media. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2015, 7: 27340–27350
- 41 Matsumoto K, Kawamura A, Miyata T. Conformationally regulated molecular binding and release of molecularly imprinted polypeptide hydrogels that undergo helix-coil transition. *Macromolecules*, 2017, 50: 2136–2144
- 42 Wang X L, Yao H F, Li X Y, et al. pH/temperature-sensitive hydrogel-based molecularly imprinted polymers (hydroMIPs) for drug delivery by frontal polymerization. *RSC Adv*, 2016, 6: 94038–94047
- 43 Gao F X, Zhao X L, He X W, et al. A pH and temperature dual-responsive macroporous molecularly imprinted cryogel for enhanced recognition capability towards ovalbumin. *Anal Methods*, 2013, 5: 6700–6708
- 44 Tang Q, Nie Y T, Gong C B, et al. Photo-responsive molecularly imprinted hydrogels for the detection of melamine in aqueous media. *J Mater Chem*, 2012, 22: 19812–19820
- 45 Gomy C, Schmitzer A R. Synthesis and photoresponsive properties of a molecularly imprinted polymer. *Org Lett*, 2007, 9: 20
- 46 Ma Y, Zhang Y, Zhao M, et al. Efficient synthesis of narrowly dispersed molecularly imprinted polymer microspheres with multiple stimuli-responsive template binding properties in aqueous media. *Chem Commun*, 2012, 48: 6217–6219
- 47 Li D J, Chen Y, Liu Z. Boronate affinity materials for separation and molecular recognition: Structure, properties and applications. *Chem Soc Rev*, 2015, 44: 8097–8123
- 48 Bi X D, Liu Z. Facile preparation of glycoprotein-imprinted 96-well microplates for enzyme-linked immunosorbent assay by boronate affinity-based oriented surface imprinting. *Anal Chem*, 2014, 86: 959–966
- 49 Xing R R, Wang S S, Bie Z J, et al. Preparation of molecularly imprinted polymers specific to glycoproteins, glycans and monosaccharides via boronate affinity controllable-oriented surface imprinting. *Nat Protoc*, 2017, 12: 964–987

Summary for “刺激-响应型蛋白质分子印迹材料的研究进展”

Progress of stimuli-responsive molecular imprinted materials for capture/release of proteins

Juan Qiao^{1,2} & Li Qi^{1,2*}

¹ Beijing National Laboratory for Molecular Sciences, Key Laboratory of Analytical Chemistry for Living Biosystems, Institute of Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China;

² School of Chemical Sciences, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

* Corresponding author, E-mail: qili@iccas.ac.cn

To date, molecular imprinting (MIP) materials towards proteins have been utilized in a wide range of applications encompassing the fields of samples purification, proteomics, life science, biosensor, pharmaceutical research and drug delivery. Although tremendous progress has been made in MIP technique field, the large size of macromolecules would lead to low transmission and diffusion efficiency during MIP processes, and further cause difficult in adsorption and desorption of target proteins. Therefore, great challenges still remain to be addressed, especially in the design of unique and advanced MIP materials towards macromolecules. More recently, stimuli-responsive MIP materials have attracted considerable interest because they can respond to external stimuli while modulating their affinities for the target proteins and endowing switchable capacities of the binding/releasing processes. In this review, an overview of different stimuli-responsive MIP materials towards proteins developed from 1998 to now, especially the synthetic methods, monomer species, intelligent modulating principle and application has been provided. Moreover, the future of intelligent stimuli-responsive MIP materials for target proteins is expounded.

In the first section, the classical MIP fabrication process and mechanism of MIP materials have been described: template incubating with the function monomers, polymerization and template removing. Then the fundamental properties of classical MIP materials including high selectivity, stability and excellent reusability without loss of activity have been discussed. However, the MIP materials are mainly utilized as adsorbents for extraction of the small molecules. When it comes to template with large molecules, such as proteins, the MIP materials suffered from the lower diffusion efficiency and needed harsh elution conditions. Therefore, to approach challenges, new materials-the stimuli-responsive MIP materials should be explored. In the second section, several methods for synthesis of stimuli-responsive MIP materials have been introduced in detail, including bulk polymerization, emulsion polymerization, precipitation polymerization, suspension polymerization and surface imprinting method. Moreover, the advantages and shortcomings of each method and its application have been summarized. Combination of MIP materials with stimuli-responsive properties has attracted significant research interest. In the third section, a general summary of stimuli-responsive MIP technology has been made, including the design of thermo/pH sensitive MIP materials and its application in proteins analysis. Finally, this review performs prospect for the future development of stimuli-responsive MIP technology including the limitation in theoretical study, synthesis method and commercial products. The stimuli-responsive MIP materials have displayed great potential anyhow in several applications including drug delivery and environmental protection owing to their versatility properties.

stimuli-responsive polymers, molecular imprinting materials, protein capture/release

doi: 10.1360/N972018-00919