

牛血清蛋白分子印迹聚合物的制备及分子识别性能

袁士芳, 王硕, 邓启良, 方国臻

(天津科技大学食品营养与安全实验室, 天津 300457)

摘要: 本文报道了以活化硅球为支撑载体, 将其表面用 3-氨基丙基三乙氧基硅烷(APTES)和戊二醛进行修饰, 通过醛基共价键和牛血清蛋白(BSA), 同时以丙烯酰胺(AAm)为单体, *N,N'*-亚甲基双丙烯酰胺(MBA)为交联剂, 在水相体系中合成对 BSA 具有较高选择性的新型分子印迹聚合物。通过对合成的聚合物进行平衡结合, 吸附动力学和选择性的三个表征实验发现, 该聚合物对 BSA 具有选择性高、传质速度和结合平衡速度快等诸多优点, 并通过 Langmuir 方程分析, 证明平衡结合中吸附容量(Q)与初始浓度(C)的一致性, 并呈良好的线性关系, 印迹聚合物的饱和吸附容量 Q_{\max} 为 28.98 mg/g。

关键词: 分子印迹; 共价键和; 牛血清蛋白; 活化硅球

文章编号: 1673-9078(2013)1-134-137

Fabrication of Bovine Serum Albumin in Imprinted Polymer on Silica Surface and Its Molecular Recognition Function

YUAN Shi-fang, WANG Shuo, DENG Qing-liang, FANG Guo-zheng

(Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: A novel molecularly imprinted polymer has been prepared using silica gel as support material, bovine serum albumin (BSA) as template, acrylamide (AAm) as functional monomer and *N,N'*-methylenebisacrylamide (MBA) as cross-linker in aqueous medium. The silica gel was modified by 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES) and glutaraldehyde and then reacted with BSA by forming imine bonds to covalently immobilize the template protein. The static and kinetic adsorption properties of the imprinted polymer were evaluated. The results showed that the imprinted sorbent exhibited good recognition, selective ability and offered a faster kinetics for the adsorption of the template BSA. The results of the Langmuir model evaluation indicated that the adsorption isotherm of imprinted polymer towards the template molecule were in good accordance and with linearity. The maximum adsorption capacity (Q_{\max}) of imprinted sorbent toward BSA was 28.98 mg/g.

Key words: molecular imprinting; covalent immobilization; bovine serum albumin; activated silica gel

分子印迹技术 (Molecularly imprinted technique, MIT) 是从仿生角度, 采用人工方法制备对特定分子 (模板分子) 具有专一性结合作用和特定空间结构空穴的聚合物—分子印迹聚合物 (Molecular imprinted polymer, MIP) 的技术^[1-2]。目前分子印迹技术已成功用于印迹一些低分子量、难溶于水的化合物^[3-7], 但对于生物大分子蛋白质仍然存在许多问题。因为高度交联的三维材料不利于生物大分子的扩散; 印迹一般是在有机溶剂中, 而蛋白质分子在有机溶剂中易变性。为克服上述缺陷, 越来越多的研究者开始关注在水溶液环境中合成蛋白质分子印迹聚合物^[8-9]。由于 MIP 具有构象预定性、特异识别性、长期稳定性及实施简便性等优点, 在生物大分子的富集、手性化合物的分离、固相萃取及敏感膜传感器等诸多领域具有重要的应用前景^[10]。本研究报道了一种合成表面印迹牛血清

收稿日期: 2012-08-28

作者简介: 袁士芳 (1985-), 女, 博士, 研究方向: 食品安全与检测

白蛋白的印迹聚合物的新方法, 以活化硅球为载体, 将其表面醛基化后, 通过亚胺键共价键合牛血清白蛋白; 再用丙烯酰胺和 *N,N'*-亚甲基双丙烯酰胺在水相体系中进行聚合, 得到牛血清白蛋白分子印迹聚合物。通过吸附实验表明, 用本方法合成的分子印迹聚合物对模板蛋白质显示出选择性吸附能力。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

Cary50-Bio型紫外可见分光光度计, 澳大利亚 Victoria公司; RF-KT/C型加热磁力搅拌器, 天津欧诺仪器仪表有限公司; ZK-35BS型电热真空干燥箱, 天津三水科学仪器有限公司; SY型型电热式恒温水浴锅, 天津欧诺仪器仪表有限公司。

硅球为80~120目, 青岛海洋化工有限公司; 3-氨基丙基三乙氧基硅烷 (APTES), 武大有机硅新材料股份有限公司; 牛血清蛋白 (BSA, 分子量 (MW) 67 kDa,

等电点(pI 4.8), 牛血红蛋白(BHb, MW 64.5 kDa, pI 6.7), 马肌红蛋白(MB, MW 16.7 kDa, pI 7.0), 细胞色素c(Cytc, MW 12.4 kDa, pI 9.8), 溶菌酶(Lyz, MW 14.4 kDa, pI 11.2), 丙烯酰胺(AAm), *N,N'*-亚甲基双丙烯酰胺(MBA), 十二烷基硫酸钠(SDS)均为上海生工产品。其余试剂分析纯。

1.2 蛋白质分子印迹聚合物的制备

1.2.1 载体硅球活化

8.0 g硅球(80~120目)置于250 mL三颈瓶中, 加入60 mL 33% 甲烷磺酸水溶液, 电磁搅拌下回流反应8 h。滤出固体, 用蒸馏水反复冲洗至水溶液为中性, 于70 °C真空干燥8 h^[11]。

1.2.2 载体硅球的衍生化

0.5 g活化硅球分散在50 mL甲醇中, 加入5 mL APTES, 磁力搅拌70 °C回流12 h。滤出固体, 用甲醇和去离子水反复冲洗, 于70 °C真空干燥8 h。

0.5 g接入氨基的硅球浸渍在20 mL含0.2 mol/L戊二醛的PBS溶液中(pH 6.2, 0.01 mol/L), 室温下搅拌12 h, 滤出固体, 去离子水反复冲洗, 冻干备用^[12]。

1.2.3 化学键合牛血清蛋白及分子印迹聚合物的制备

取0.1 g醛基修饰的硅球, 与80 mg BSA, 共同溶于5 mL PBS缓冲液中(pH 7.0, 0.01 mol/L), 室温反应1 h; 随后加入285 mg AAm, 15 mg MBA, 磁力搅拌3 h; 向体系中通入氮气5 min以出去氧气; 加入100 μL 10% (m/V)过硫酸铵溶液(APS), 100 μL 5% (V/V) *N,N,N,N'*-四甲基乙二胺溶液(TEMED), 25 °C水浴聚合24 h。聚合反应结束后, 用10% (m/V) SDS; 10% (V/V)乙酸溶液洗脱模板12 h, 40 °C真空干燥。

1.3 印迹聚合物对不同蛋白质的分子识别性能评价

1.3.1 紫外分光光度计测试条件的确定

配制BSA 1 mg/mL标准溶液在紫外分光光度计进行全波长扫描, 选择合适的检测波长。发现在λ=279.9 nm时, BSA有较大吸收, 因此选定为紫外检测波长。

1.3.2 标准曲线的绘制及吸附容量(Q)的计算

紫外分光光度计标准曲线: 准确量取对应体积的BSA标准储备液(2 mg/mL), 用pH 7.0, 0.01 mol/L的PBS溶液稀释成浓度为0.25、0.50、0.75、1.00、1.25、1.50、1.75 mg/mL的标准使用液, 在紫外分光光度计(λ=279.9 nm)上测定吸光度值, 绘制标准曲线。

根据标准曲线和吸附后的溶液吸光度值, 求得在吸附平衡后溶液中剩余的目标物的浓度, 根据吸附前后溶液中目标物的浓度变化, 可由公式(1)求出吸附容量Q(mg/g):

$$Q = \frac{(C_i - C_f)}{W} \times V \quad (1)$$

式中, C_i 为初始浓度(mg/mL), C_f 为吸附后溶液浓度(mg/mL), V 为加入的吸附溶液体积(mL), W 为聚合物用量(mg)。

2 结果与分析

2.1 紫外检测条件的确定与标准曲线的绘制

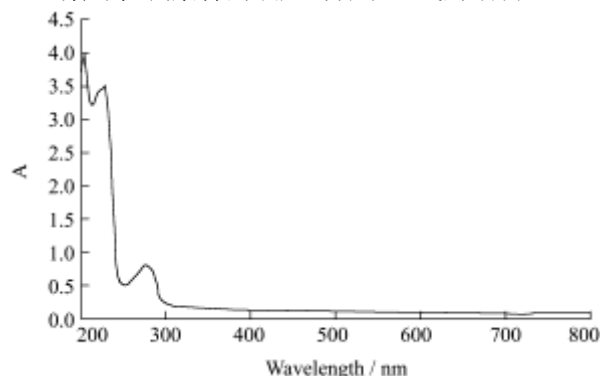


图1 BSA标准溶液全波长扫描谱图

Fig.1 Spectra of standard solution of BSA scanning in whole wavelength

通过对BSA标准溶液的全波长扫描(200~800 nm), 得到全波长扫描图(图1)。BSA在λ=279.9 nm条件下有最大吸收, 选定为紫外检测波长。

依据1.3.2提供的标准曲线绘制方法, 分别绘制了表征实验中的BSA标准曲线, 具有良好的线性。如图2所示:

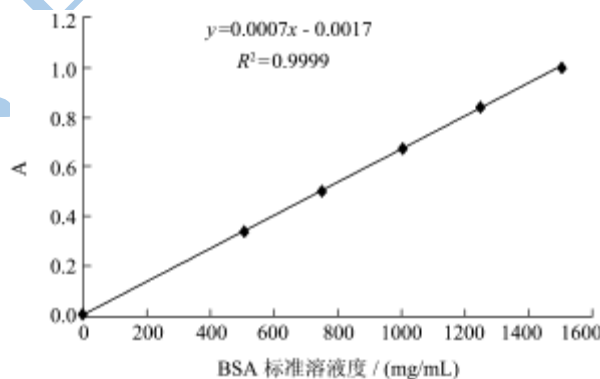


图2 BSA标准曲线

Fig.2 The standard curves of BSA

2.2 功能单体与交联剂的配比

在分子印迹技术中, 功能单体与交联剂的配比会在很大程度上影响合成的聚合物中特异性吸附孔穴的形成和分布。因此, 要在溶剂对功能单体、模板分子以及交联剂都能充分溶解的情况下, 首先优化功能单体和交联剂的配比。

本实验以BSA为模板分子, AAm为功能单体, MBA为交联剂, APS和TEMED为引发剂。实验对功能单体和交联剂这两种重要反应物的添加量设计了多组配比, 分别合成后考察各自的吸附容量, 进而得出功能单体和交联剂的最佳质量比, 制备吸附和识别效果

最理想的聚合物。实验设计的功能单体和交联剂的质量配比见表1。

表 1 不同功能单体和交联剂质量配比合成聚合物效果比较

Table 1 The compared results of BSA imprinted polymer with different ratio of functional monomer and cross-linker

AA:MBA	19:1	16:1	14:1	9:1	2:1
Q _{MIP}	6.72	15.46	13.74	22.27	18.28
Q _{NIP}	6.14	12.89	10.95	10.00	9.66
α	1.09	1.20	1.25	2.23	1.89

注: $\alpha = \frac{Q_{MIP}}{Q_{NIP}}$

实验结果表明,功能单体与交联剂质量比为9:1时,所得的印迹聚合物具有最佳的选择性和识别能力。而按照2:1比例制备的聚合物由于加入了过量的功能单体和交联剂,无选择性吸附孔穴在聚合物中占据的体积比例较大,降低了聚合物的吸附容量并加重了非特异性吸附,因而在本体聚合中,加入的功能单体和交联剂并不是量越多越好。功能单体、交联剂的质量比为9:1作为聚合物合成的最佳比例。

2.3 聚合物对 BSA 的动力学实验

为了考察分子印迹聚合物对模板分子的吸附速率,在分子印迹聚合物加入量5.0 mg和BSA-PBS溶液5 mL、初始浓度为1.0 mg/mL的情况下,测定了不同吸附时间(t)条件下,分子印迹材料对模板分子BSA的吸附容量,如图3所示。

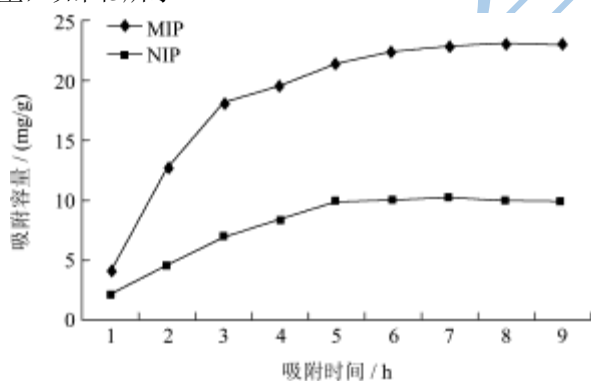


图 3 印迹聚合物吸附动力学曲线

Fig.3 Kinetic uptake plot of imprinted polymer

实验结果表明:制备的印迹聚合物具有较高的吸附速度,吸附2 h达到吸附容量的57.2%,吸附4 h之后达到吸附容量的81.4%左右,10 h之后吸附基本达到平衡。在吸附初期,载体硅球表面有大量的印迹位点,所以模板蛋白易于结合到印迹位点上;随着识别位点被占用,吸附速率会显著降低,吸附过程达到平衡。与非印迹聚合物相比,印迹聚合物有更高的吸附容量。

2.4 聚合物对 BSA 的平衡结合实验

为了评价所合成的聚合物对模板分子BSA的结合

能力,实验中测定了室温下在0.1~1.4 mg/mL浓度范围内,印迹材料吸附容量Q随BSA初始浓度的变化趋势。

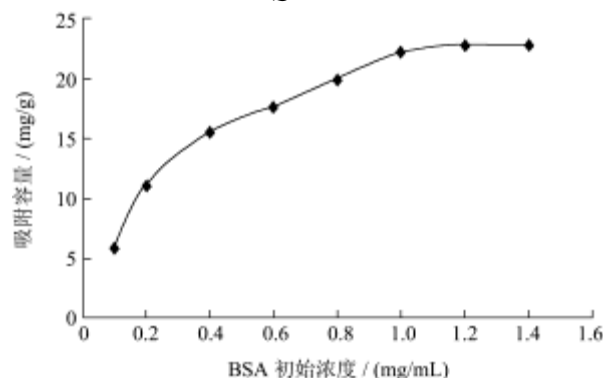


图 4 BSA 分子印迹聚合物吸附容量曲线

Fig.4 Adsorption isotherms of molecularly imprinted polymer

由图4可以看出,随着BSA初始浓度的增大,印迹聚合物对BSA的吸附容量也随之增大。在BSA初始浓度较低时,BSA的量不足以使特异性结合为位点饱和。当BSA的浓度增加时,特异性结合位点逐渐饱和,从而达到吸附平衡。在1.0 mg/mL浓度时,印迹聚合物吸附容量达到最大值22.27 mg/g。

2.5 Langmuir 方程分析

在分子印迹技术研究中常采用Langmuir模型^[13]来评价分子印迹聚合物的吸附特性:

$$\frac{C_e}{Q} = \frac{C_e}{Q_{max}} + \frac{1}{bQ_{max}} \quad (2)$$

其中C_e为达到吸附平衡时的浓度(mg/mL),Q是指达到吸附平衡时的吸附容量(mg/g),而Q_{max}是指最大饱和吸附容量,b是Langmuir平衡常数(mL/mg)。

结果见图5。

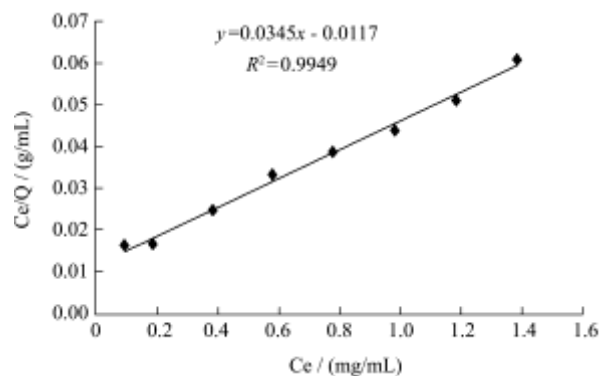


图 5 印迹聚合物的 Langmuir 分析曲线

Fig.5 Linearized Langmuir plot of imprinted polymer

进行线性回归,可得到一条线性良好的直线,回归方程为: $Q/C=0.0345C+0.0117$, 相关系数为 $R^2=0.9949$ 。

由该曲线的斜率和截距可求得印迹聚合物的饱和吸附容量 $Q_{max}=28.98 \text{ mg/g}$ 。结果表明印迹聚合物对模板分子具有结合作用,聚合过程形成了比较明显的印迹

位点。

2.6 印迹聚合物对BSA的吸附选择性实验

特定选择性是分子印迹聚合物最显著的特征之一，由于洗脱模板分子后留下了与其形状与结合部位相互对应的空腔，此空腔可对模板分子进行选择识别。印迹聚合物的选择特性可以用印迹因子 α 和选择性因子 β 来表征^[13]。印迹因子 α 定义为：

$$\alpha = \frac{Q_{MIP}}{Q_{NIP}} \quad (3)$$

Q_{MIP} 表示模板分子或者类似物在印迹聚合物上的吸附容量 (mg/g)， Q_{NIP} 表示模板分子或者类似物在非印迹聚合物上的吸附容量 (mg/g)。

选择性因子 β 定义为：

$$\beta = \frac{\alpha_{tem}}{\alpha_{ana}} \quad (4)$$

α_{tem} 表示对模板分子的印迹因子， α_{ana} 表示对类似物的印迹因子。

在实验中，选用非模板蛋白BHb，MB，Lyz，Cyt c为底物，研究了印迹聚合物及其非印迹聚合物对非模板蛋白的选择性。吸附容量结果见图6，印迹因子 α 值和选择性因子 β 见表2。

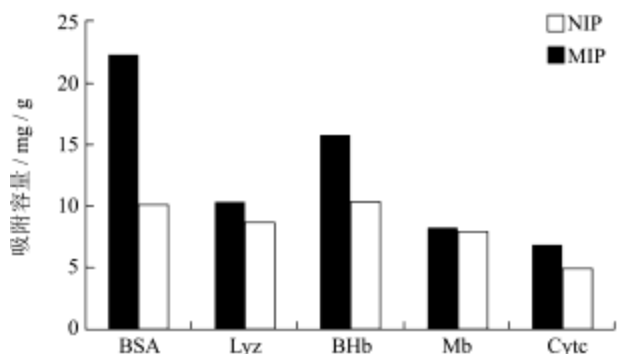


图6 印迹和非印迹聚合物对不同蛋白质的选择性吸附

Fig.6 Selective adsorption of different proteins by imprinted and non-imprinted polymer

表2 聚合物对不同和蛋白的选择性

Table 2 The selectivity of MIP for different proteins

Protein	Q_{MIP} (mg/g)	Q_{NIP} (mg/g)	α	β
BSA	22.27	10.00	2.23	-
Lyz	10.22	8.72	1.17	1.91
BHb	15.66	10.22	1.53	1.46
MB	8.10	7.87	1.03	2.16
Cyt c	6.67	4.85	1.37	1.63

实验结果表明，五种蛋白中模板分子BSA的印迹因子 α 最大为2.23，而其他几种蛋白的 α 均小于2。这是由于印迹聚合物表面有许多特异性结合位点，可以特异性识别模板分子。而印迹空穴的识别位点与其他非

模板蛋白的结构不互补，非模板蛋白的吸附量相对较少。对非印迹聚合物而言，主要是靠非特异性吸附来吸附蛋白。选择性实验表明，该印迹聚合物对BSA有较高的选择性。

3 结论

3.1 本试验以活化硅球为支撑载体，将其表面用3-氨基丙基三乙氧基硅烷(APTES)和戊二醛进行修饰，通过醛基共价键和牛血清蛋白(BSA)，同时以丙烯酰胺(AAm)为单体， N,N' -亚甲基双丙烯酰胺(MBA)为交联剂，在水相体系中合成对BSA具有较高选择性的新型分子印迹聚合物。

3.2 单体与交联剂的比例会影响印迹聚合物的吸附性能，经过一系列实验，结果确定，单体与交联剂的质量比为 AA:MBA=9:1 时得到的聚合物印迹效果最好。

3.3 与非印迹聚合物相比，印迹聚合物具有较高的吸附容量和较快的吸附速率，本实验制备的印迹聚合物吸附 2 h 达到吸附容量的 57.2%，吸附 4 h 之后达到吸附容量的 81.4%左右，10 h 之后吸附基本达到平衡。同时，印迹聚合物对 BSA 具有较高的吸附容量， Q_{max} 为 28.98 mg/g。

3.4 印迹聚合物对模板分子具有较高的选择性，其印迹因子为 2.23。

参考文献

- [1] Chou P C, Rick J, Chou T C. Ultrasonic acoustic wave detection of single or capillary electrophoretically resolved underivatized amino acids [J]. Analytica Chimica Acta, 2005,524 (1):20-25
- [2] Son S H, Jegal J. Chiral separation of D, L-serine racemate using a molecularly imprinted polymer composite membrane [J]. Journal of Applied Polymer Science, 2007, 104(3): 1866-1872
- [3] Sellergren B, Shea K J. Chiral ion-exchange chromatography: Correlation between solute retention and a theoretical ion-exchange model using imprinted polymers [J]. Journal of Chromatography A, 1993,654(1): 17-28
- [4] Wulff G, Minarik M J. Template imprinted polymers for HPLC separation of racemates [J]. Liquid Chromatogr, 1990, 13: 2987-3000.
- [5] Schweitz L, Andersson L I, Nilsson S. Capillary electrochromatography with molecular imprint-based selectivity for enantiomer separation of local anaesthetics [J].

- Journal of Chromatography A, 1997, 792(1-2): 401-409
- [6] Mosbach K, Ramström O. The emerging technique of molecular imprinting and its future impact on biotechnology [J]. *Biotechnology*, 1996, 14: 163-170
- [7] Joshi V P, Kulkarni M G, Mashelkar R A. Molecularly imprinted adsorbents for positional isomer separation [J]. *Journal of Chromatography A*, 1999, 849(2): 319-330
- [8] Rick J, Chou T C. Imprinting unique motifs formed from protein-protein associations [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2005, 542(1): 26-31
- [9] Rick J, Chou T C. Enthalpy changes associated with protein binding to thin films [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2005, 20(9): 1878-1883
- [10] Zhu X L, Su Q D, Cai J B, et al. Molecularly imprinted polymer membranes for substance-selective solid-phase extraction from aqueous solutions [J]. *Journal of Applied Polymer Science*, 2006, 101(6): 4468-4473
- [11] 潘明飞. 恩诺沙星分子印迹聚合物的制备及应用[D]. 天津: 天津科技大学, 2009
- [12] Zhang W, Qin L, He X W, et al. A Novel surface modified molecularly imprinted polymer using acryloyl- β -cyclodextrin and acrylamide as monomers for selective recognition of lysozyme in aqueous solution [J]. *Journal of Chromatography A*, 2009, 1216(21): 4560-4567
- [13] Zhang W, Qin L, Chen R R, et al. Protein imprinted polymer using acryloyl- β -cyclodextrin and acrylamide as monomers [J]. *Applied Surface Science*, 2010, 256(9): 3000-3005