论文

厚度可控蛋白质印迹海藻酸钙水凝胶膜的制备和表征

宋欢语^①, 赵孔银^{①②*}, 李思迪^②, 魏梦梦^{①②}, 张志箭^①, 孙平平^②, 诸葛芳^②, 焦蕊^②

① 天津工业大学省部共建分离膜与膜过程国家重点实验室, 天津 300387;

② 天津工业大学材料科学与工程学院, 天津 300387

* E-mail: zhaokongyin@tjpu.edu.cn

收稿日期: 2016-04-26; 接受日期: 2016-07-20; 网络出版日期: 2016-09-02

国家自然科学基金(批准号: 51103102)、国家级大学生创新创业训练计划(编号: 201510058080, 201510058018)、天津市应用基础与前沿技术研究计划(编号: 15JCQNJC08900, 16JCZDJC37500)和天津市科技计划(编号: 15PTSJC00240)资助项目

摘要 以牛血清白蛋白(BSA)为模板, 海藻酸钠(NaAlg)为主要原料, 通过钙离子交联制备了BSA印迹海藻酸钙(CaAlg)水凝胶膜. 通过自制的缠绕不同直径铜丝的玻璃棒控制膜的厚度. 采用扫描电子显微镜、激光共聚焦显微镜和3D超景深显微镜对BSA印迹海藻酸钙水凝胶(CaAlg MIP)膜的表面形貌进行表征. 研究了铜丝直径与得到的CaAlg MIP膜厚度之间的关系. 研究了不同NaAlg浓度制备的CaAlg MIP膜的力学性能. 用圆二色光谱研究了洗脱后BSA的构象. 探讨不同洗脱液制备的不同厚度CaAlg MIP膜对BSA的吸附性能. 结果表明, CaAlg MIP膜对BSA的吸附量明显优于非印迹膜. MIP膜制备和洗脱过程未改变蛋白质的构象. CaAlg MIP制备简单, 厚度可控, 成本低, 生物相容性好, 在药物释放、细胞培养和组织工程领域具有良好应用前景.

关键词 海藻酸钙水凝胶, 分子印迹膜, 牛血清白蛋白(BSA), 吸附, 厚度可控

1 引言

分子印迹是制备与模板分子有特殊识别结合位点的聚合物(称为分子印迹聚合物MIP)的技术^[1]. 由于分子印迹聚合物具有识别性、预定性和实用性的特点, 因此在近几十年内得到快速发展, 广泛应用于固相萃取^[2]、仿生传感器^[3]、色谱分离、酶催化模拟和药物控释^[4]等领域. 分子印迹的模板分子多为糖类衍生物、甾醇、农药、氨基酸及小分子药物等^[5], 这些小分子模板的印迹发展迅速并取得了较好效果, 但对

大分子模板如蛋白质的印迹研究则相对滞后. 已报道的蛋白质模板主要有血清蛋白、血红蛋白、溶解酵素、肌酸激酶等^[6]. 蛋白质分子印迹的困难是因为蛋白质结构复杂, 易受到温度、pH和有机溶剂等条件的影响而变性或改变构象^[7-9]. 蛋白质的构象改变甚至变性会引起识别位点不稳定. 此外蛋白质庞大的体积也难以使其从印迹聚合物中洗脱完全^[9].

水凝胶是由三维高分子网络与溶剂水组成的体系, 能显著地溶胀于水但不溶解于水. 水凝胶含水量高, 生物相容性好, 被广泛应用于组织工程、药物缓释

引用格式: 宋欢语, 赵孔银, 李思迪, 等. 厚度可控蛋白质印迹海藻酸钙水凝胶膜的制备和表征. 中国科学: 技术科学, 2016, 46: 931-939
Song H Y, Zhao K Y, Li S D, et al. Preparation and characterization of protein molecular imprinted calcium alginate hydrogel film with controllable thickness (in Chinese). Sci Sin Tech, 2016, 46: 931-939, doi: 10.1360/N092016-00154

和伤口修复. 目前基于水凝胶材料的分子印迹技术已应用于金属离子、小分子药物以及生物大分子. 由于水凝胶的软湿特性对蛋白质构象的维持有很大优势, 因此有关蛋白质印迹水凝胶的研究受到许多关注^[10]. Zhao等人^[11]以丙烯酰胺为功能单体, 以牛血清白蛋白(BSA)为模板分子, 通过紫外辐照接枝技术将BSA分子印迹聚丙烯酰胺水凝胶接枝到聚丙烯无纺布表面. Qin等人^[12]以丙烯酰胺和N-(4-乙基)-苯亚氨乙酸为功能单体, N-异丙基丙烯酰胺为温敏单体, 以溶菌酶为模板蛋白, 采用冷冻聚合法获得可印迹目标分子溶菌酶的大孔温敏印迹水凝胶. Vaidya等人^[13]利用丙烯酰胺和N,N-乙烯基-二丙烯酰胺制备了胰岛素印迹聚合物水凝胶. 但上述聚合过程产生的聚合热或引发条件易造成蛋白质变性或构象改变, 导致吸附量降低, 识别效果变差.

海藻酸钠由 β -D-甘露糖醛酸(β -D-mannuronic acid, M)和 α -L-古洛糖醛酸(α -L-guluronic acid, G)组成, 是从褐藻类的海带或马尾藻中提取的无毒无害天然高分子^[14]. 当遇到二价阳离子如 Ca^{2+} 时, G单元上的 Na^+ 与二价阳离子发生离子交换反应, 导致G单元堆积形成交联网络结构, 生成海藻酸盐水凝胶. 由于其温和的凝胶环境和良好的生物相容性成为研究最多的生物材料之一^[15-19]. 张凤菊等人^[15]以海藻酸钠为材料制备了BSA印迹海藻酸钙水凝胶微球. Zhao等人^[16]以 CaCl_2 交联海藻酸钠和磷酸氢二铵, 制备了BSA印迹磷酸/海藻酸钙凝胶微球. 然而, 制备蛋白质印迹海藻酸钙水凝胶微球时使用有机溶剂作为分散介质, 造成蛋白质变性或构象变化^[20], 存留有机溶剂影响材料的生物相容性. Bayer等人^[21]用延流法制备了蛋白质印迹海藻酸钙膜, 然而这种方法不容易控制膜厚度及其均匀性, 且该文献表征手段较少.

本文通过缠绕不同直径铜丝的玻璃棒控制水凝胶膜的厚度, 得到厚度可控的蛋白质印迹海藻酸钙水凝胶膜. 采用扫描电子显微镜, 激光共聚焦显微镜和3D超景深显微镜观测了其形貌, 研究了不同洗脱液不同厚度的膜对模板蛋白的吸附性能.

2 实验部分

2.1 试剂与仪器

海藻酸钠(NaAlg, 化学纯, 国药集团化学试剂有

限公司), 氯化钠和氯化钙(分析纯, 上海申翔化学试剂有限公司), 磷酸盐缓冲液和Tris-HCl缓冲剂(天津市化学试剂二厂), 牛血清蛋白(BSA, 色谱纯, 联星生物科技有限公司), 罗丹明荧光标记BSA(西安瑞禧生物科技有限公司), 蛋白卵清蛋白(Ova)、过氧化氢酶(Cat)和丙种球蛋白(Glo)(色谱纯, 天津市血液研究所提供), 所有试剂使用前均未纯化.

紫外分光光度计(TU-1901, 北京普析通用仪器有限公司), 拉伸试验机(LLY-06F, 莱州市电子仪器有限公司), 扫描电子显微镜(SEM, S-4800, HITACHI, 日本), 激光共聚焦显微镜(CLSM, Leica TCS SP8, 德国), 3D超景深显微镜(LEICA ZI6APOA, 德国), 圆二色光谱仪(Jasco J-815, 日本).

2.2 BSA印迹海藻酸钙水凝胶膜的制备

图1为BSA印迹海藻酸钙水凝胶膜(CaAlg MIP)的制备示意图. 将0.0268 g BSA和0.5128 g NaAlg溶解于20 mL蒸馏水中, 静置消除气泡, 得到铸膜液. 取3~5 g铸膜液倒在平板玻璃上, 用缠绕不同直径铜丝(0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.6, 0.9, 1.3 mm)的玻璃棒刮膜以控制铸膜液膜的厚度. 把膜放入2.5wt% CaCl_2 水溶液中交联5 h, 将含BSA的海藻酸钙水凝胶膜刻制成直径20 mm的圆片. 分别取一张小圆片放入10 mL的Tris-HCl缓冲液(pH7.4), NaCl溶液(0.9wt%)和PBS缓冲液(pH6.86)中, 振荡洗脱24 h, 中间更新一次洗脱液脱除BSA后, 得到BSA印迹海藻酸钙水凝胶膜(CaAlg MIP). 非印迹海藻酸钙水凝胶膜(CaAlg NIP)除了不加BSA, 也按上述方法制备.

2.3 不同厚度CaAlg MIP膜透光度测试

用数显千分测厚规测试CaAlg MIP膜的厚度. 将

图1 (网络版彩图)BSA印迹海藻酸钙水凝胶膜(CaAlg MIP)制备示意图

不同厚度的CaAlg MIP膜粘在石英比色皿上,用紫外分光光度计的透光率测试模块测试湿态下CaAlg MIP膜的透光度。

2.4 形貌表征

采用数码相机和激光共聚焦显微镜拍摄洗脱蛋白质前后湿态下CaAlg MIP的表面形貌;用3D超景深显微镜观察湿态下CaAlg MIP的形貌。

用扫描电子显微镜(SEM)观察洗脱前后冷冻干燥的CaAlg MIP膜的表面形貌,测试前先喷金。

2.5 力学性能测试

参考文献[22]用拉伸机测试不同NaAlg浓度制备的湿态下CaAlg MIP膜的拉伸力学性能。测试样条长20 mm,宽度5 mm,拉伸速率10 mm/min。

2.6 圆二色光谱测试

测试BSA水溶液及经过不同洗脱液洗脱的BSA溶液的圆二色光谱,并用自带软件(J-815 Spectra Manager 2.0)分析BSA的构象。

2.7 BSA吸附性能测试

分别将印迹和非印迹膜放入10 mL浓度为1.34 mg/mL的BSA溶液中^[23],每隔一段时间测试溶液的紫外吸光度计算蛋白质浓度的变化,计算平衡吸附容量(mg/g)。印迹效率(IE)定义为印迹膜对BSA平衡吸附容量与非印迹膜对BSA平衡吸附容量的比值。

为测试MIP膜对BSA的选择性吸附性能,分别配制BSA, Ova, Cat和Glo的水溶液,浓度均为1.34 mg/mL。分别将印迹和非印迹膜放入10 mL上述蛋白质溶液中,12 h后测试各蛋白质溶液的紫外吸光度,计算其平衡吸附容量(mg/g)。

3 结果与讨论

3.1 BSA印迹海藻酸钙水凝胶膜的形貌

图2为不同厚度的CaAlg MIP的数码照片。厚度为 0.099 ± 0.02 mm的CaAlg MIP膜透明度较大,随着膜厚度的增加,其透明度逐渐降低,当厚度为 0.399 ± 0.04 mm时,膜变得几乎不透明。通过本文的方法可以很方便地得到不同厚度的海藻酸钙水凝胶膜,且由于没有

使用有毒有机溶剂,得到的水凝胶生物相容性好,有利于其在组织工程中的应用。在BSA印迹过程中蛋白质BSA也不会变性。

图3为不同直径的铜丝与膜厚度,以及膜透光度的关系图。通过在玻璃棒上缠绕不同直径的铜丝得到不同厚度的海藻酸钠铸膜液,从而得到不同厚度的CaAlg MIP膜。从图中可见,当铜丝直径小于0.6 mm时,CaAlg MIP膜厚度与铜丝直径成正比关系。由于海藻酸钠在钙离子交联过程中体积收缩,导致50%左右的水被排除到凝胶外,因此得到的膜厚度仅为铜丝直径的50%左右。但是当铜丝直径增加到0.6 mm以上时,膜厚度接近原来海藻酸钠溶液厚度的60%。这与较厚的

图2 (网络版彩图)不同厚度的CaAlg MIP数码照片
(a) 0.099 mm; (b) 0.200 mm; (c) 0.300 mm; (d) 0.399 mm

图3 (网络版彩图)不同直径铜丝与膜厚度以及膜透光度的关系图

海藻酸钠溶液不容易完全交联有关. 随着膜厚度增加, 其透光度迅速下降. 当CaAlg MIP膜厚度大于0.6 mm时膜已经变得几乎不透明.

图4为CaAlg MIP洗脱前与洗脱后的SEM照片. 可以看出CaAlg MIP洗脱前表面平滑(图4(a)), 而洗脱后略显粗糙(图4(b)), 这是因为洗脱BSA后在CaAlg MIP上留下了印迹孔穴, 造成膜表面的形貌变化.

图5为经pH为8.3的Tris-HCl缓冲液洗脱前后湿态膜的激光共聚焦显微镜照片, 膜厚度为0.20 mm. 经过Tris-HCl缓冲液的洗脱, 绝大部分罗丹明荧光标记BSA被洗脱掉, 这与文献报道的一致^[20]. 图6为CaAlg MIP

图4 CaAlg MIP洗脱前后的SEM照片.
(a) 洗脱前; (b) 洗脱后

图5 (网络版彩图)洗脱BSA前后湿态MIP膜的激光共聚焦显微镜照片
(a) 洗脱前; (b) 洗脱后

图6 CaAlg MIP膜的3D超景深照片

的3D超景深显微镜照片, 可看到膜表面具有一些凸起和凹槽结构, 这些结构显著地增加了膜的比表面积, 利于蛋白质的洗脱和重吸附.

3.2 不同NaAlg浓度的CaAlg MIP膜的力学性能

图7为不同NaAlg浓度制备的湿态CaAlg MIP膜的力学拉伸性能. 当NaAlg浓度低于2.5wt%时, 膜的极限应力随NaAlg浓度的增大而增加, NaAlg浓度为2.5wt%时应力达到最大值, 之后则随之下降. NaAlg浓度低于2.5wt%时, 随着其含量增加, 聚合物链之间的距离变小, 从而链间作用力增大, 力学性能提高. 此结果与文献报道的研究结果相符合^[24]. 当NaAlg浓度高于2.5wt%后, 由于海藻酸钠溶液黏度过大, 导致膜不均一, 且表面生成较为致密的海藻酸钙凝胶, 阻碍了钙离子扩散到其内部, 引起力学性能下降. CaAlg MIP膜的弹性模量随NaAlg浓度增加而增大(图7(b)), 可以通过增加NaAlg浓度来提高膜的初始拉伸性能. 而NaAlg浓度增加会导致断裂伸长的降低(图7(c)). 在NaAlg浓度为2.5wt%时CaAlg MIP膜获得最大断裂功, 为577.09 J m⁻².

本文使用的NaAlg原料为中高黏度(10 g/L, 20℃为200±20 mPa s). 因此经过钙离子交联得到的CaAlg水凝胶强度较高, 这有利于其在组织工程如软骨修复中的应用.

3.3 BSA的圆二色谱

图8为BSA水溶液及经过PBS, NaCl和Tris-HCl缓冲液洗脱出的BSA溶液的圆二色谱. 在圆二色谱上均可以观察到两个强的椭圆负峰, 分别位于222和208 nm处, 这表明BSA分子的二级结构主要是 α -螺旋^[25]. 初始BSA水溶液的谱线和用不同洗脱液洗脱出来的BSA溶液的谱线十分接近. 初始BSA的[θ]208/[θ]222峰值比为1.116, 经过NaCl, PBS和Tris-HCl缓冲溶液洗脱掉的BSA的峰值比分别为1.123, 1.190和1.125. 这表明BSA在洗脱过程中未发生二级结构的变化^[26], 从而充分保持了其活性. 在大分子印迹过程中保持其构象和生物活性非常重要.

3.4 膜厚度以及洗脱液对吸附和印迹效率的影响

图9为膜厚度对CaAlg MIP膜的吸附性能和印迹效率(IE)的影响. 经过PBS, NaCl和Tris-HCl溶液洗脱后

图7 (网络版彩图)不同NaAlg浓度的CaAlg MIP膜的力学性能

(a) 应力-应变曲线; (b) 弹性模量-NaAlg浓度曲线; (c) 断裂伸长-NaAlg浓度曲线; (d) 断裂功-NaAlg浓度曲线

图8 (网络版彩图)初始BSA及洗脱BSA的圆二色光谱

得到的CaAlg MIP膜对BSA的吸附性能都明显优于非印迹膜(CaAlg NIP)。这是由于洗脱BSA后在CaAlg膜中留下BSA印迹孔穴, 而该孔穴对BSA有特异性吸附, 从而提高了CaAlg MIP膜对BSA的重吸附性能。非印迹膜由于没有加入BSA模板, 因此缺少印迹位点和孔穴,

吸附量较低。MIP膜对BSA的吸附性能和印迹效率随着膜厚度的增加而降低, 一方面膜太厚造成部分BSA没有充分洗脱, 另一方面, BSA很难吸附扩散到厚膜的内部。膜的重吸附性能没有因为使用不同洗脱液而产生很大差异, 但是考虑到CaAlg水凝胶因为钙离子被一价离子置换从而使膜逐渐失去强度, 用Tris-HCl作为洗脱液较好。MIP膜的印迹效率在2.0~2.5之间, 相比文献不算高, 这与海藻酸钙水凝胶稳定性较差有关^[7]。

3.5 BSA印迹海藻酸钙水凝胶膜的吸附动力学

图10为CaAlg MIP和NIP膜对BSA(10 mL, 1.34 mg/mL)的吸附动力学曲线, 膜厚度为0.20 mm。MIP膜比NIP膜吸附了更多BSA, 其平衡吸附容量为NIP膜的2.3倍, 达到22.71 mg/g。在前100 min, CaAlg MIP膜与NIP膜的吸附率较大, 300 min后基本达到吸附平衡。

CaAlg MIP的表面具有BSA印迹位点和孔穴, 通过这些印迹孔穴和识别位点可以吸附更多的BSA。而NIP膜由于制备时没有加入模板蛋白质, 表面缺乏印迹位点和孔穴, 只是通过范德华力等非特异性吸附实

图9 膜厚度对CaAlg水凝胶膜的吸附量以及对CaAlg MIP膜印迹效率的影响

(a) PBS洗脱; (b) NaCl洗脱; (c) Tris-HCl洗脱

图10 (网络版彩图)CaAlg MIP和NIP膜对BSA的吸附动力学曲线

图11 (网络版彩图)CaAlg MIP与NIP膜对BSA的吸附热力学曲线

现的, 因此对BSA的吸附量较低. 随着吸附时间延长, 膜表面的印迹位点和孔穴逐渐减小, 吸附率逐渐下降. 等到膜内部的孔穴和印迹位点也吸附BSA后达到吸附平衡.

3.6 BSA印迹海藻酸钙水凝胶膜的吸附热力学研究

图11为CaAlg MIP和NIP膜对BSA的吸附热力学

曲线. CaAlg MIP对BSA的平衡吸附容量比NIP的高, 这是由于MIP对BSA有特异性结合位点和孔穴(图1), 而NIP只是物理吸附. 当MIP膜的特异性结合位点结合BSA饱和后, MIP的吸附量趋于稳定. 从吸附热力学的图形来看, CaAlg MIP和NIP膜对BSA的吸附均符合Langmuir吸附模型.

3.7 CaAlg MIP和NIP膜对BSA的吸附选择性

图12为CaAlg MIP和NIP膜对单一的模板蛋白BSA及对比蛋白卵清蛋白(Ova), 过氧化氢酶(Cat) 和丙种球蛋白(Glo)的平衡吸附容量. 可以看出MIP膜对模板BSA的吸附容量比NIP高11.38 mg/g, 且对BSA的吸附量均大于对比蛋白质的吸附量. 而NIP膜对BSA和其他对比蛋白质的吸附量相差不大. 这表明CaAlg MIP具有一定的吸附选择性和识别能力. NIP膜对BSA没有选择性吸附能力.

CaAlg MIP膜对于BSA的吸附容量分别为Ova, Cat和Glo的2.3, 2.6和3.6倍. CaAlg NIP膜对于BSA的吸附容量分别为Ova, Cat和Glo的1.1, 1.2和2.1倍. CaAlg

图12 CaAlg MIP和NIP膜对BSA及对比蛋白的吸附量

MIP膜对其模板分子BSA具有一定的识别性能, 但与天然抗体相比其识别性能差距比较大. 要模拟自然界中生物识别的特异性还要考虑诸多条件如温度、pH和离子强度等因素的影响. 在接下来的研究中应进一步从材料设计, 以及材料结构与识别性能关系出发深入探讨改进识别性能的方法和识别条件.

4 结论

采用方便简洁的方法, 通过 Ca^{2+} 交联制备了厚度可控的BSA印迹海藻酸钙水凝胶膜. CaAlg膜厚度与铜丝直径成正比关系, 膜厚度为铜丝直径的50%左右. 但当铜丝直径大于0.6 mm时, 由于海藻酸钠溶液不容易被钙离子完全交联, 膜厚度为铜丝直径的60%左右. 激光共聚焦显微镜观察结果表明, 经过Tris-HCl缓冲液的洗脱, 绝大部分标记罗丹明荧光BSA被洗脱. 电子扫描显微镜、3D超景深显微镜观测到膜表面具有一些凸起和凹槽结构. 当NaAlg浓度为2.5wt%时, 膜的综合力学性能最好, 最大断裂功为 577.09 J m^{-2} . MIP膜的吸附性能和印迹效率随着膜厚度的减小而增加. MIP膜对BSA的吸附量为NIP膜的2~2.5倍, 且对BSA具有一定吸附选择性能. 圆二色光谱表明BSA在膜制备和洗脱中没有发生二级结构变化. 相比于海藻酸钙水凝胶微球, 膜更容易获得, 能大量制备, 且不使用有机溶剂, 得到的材料生物相容性更好. 本文制备的BSA印迹海藻酸钙水凝胶膜方法简单, 厚度可控, 在药物释放和组织工程领域具有良好应用前景.

参考文献

- Huynh T P, Sharma P S, Sosnowska M, et al. Functionalized polythiophenes: Recognition materials for chemosensors and biosensors of superior sensitivity, selectivity, and detectability. *Prog Polymer Sci*, 2015, 47: 1–25
- Schirhagl R, 任康宁, Zare R N. 表面印迹聚合物及其在微流控器件中的应用. *中国科学: 化学*, 2012, 7: 937–953
- Ahmad R, Griffete N, Lamouri A, et al. Nanocomposites of gold nanoparticles@molecularly imprinted polymers: Chemistry, processing, and applications in sensors. *Chem Mater*, 2015, 27: 5464–5478
- Griffete N, Fresnais J, Espinosa A, et al. Design of magnetic molecularly imprinted polymer nanoparticles for controlled release of doxorubicin under an alternative magnetic field in athermal conditions. *Nanoscale*, 2015, 7: 18891–18896
- 赵焱, 李龙, 秦伟. 基于SCI的分子印迹技术文献计量学研究. *材料导报*, 2015, 5: 105–109
- 张现峰, 杜学忠. 蛋白表面分子印迹技术. *化学进展*, 2016, 1: 149–162
- Byrne M E, Park K, Peppas N A. Molecular imprinting within hydrogels. *Adv Drug Deliver Rev*, 2002, 54: 149–161
- 王红飞, 杨浩, 张黎明. 具酯酶活性的温敏型分子印迹微凝胶. *中国科学: 化学*, 2011, 41: 524–530
- Li S, Cao S, Whitcombe M J, et al. Size matters: Challenges in imprinting macromolecules. *Prog Polym Sci*, 2014, 39: 145–163
- Verheyen E, Schillemans J P, van Wijk M, et al. Challenges for the effective molecular imprinting of proteins. *Biomaterials*, 2011, 32: 3008–3020
- Zhao K, Lin B, Cui W, et al. Preparation and adsorption of bovine serum albumin-imprinted polyacrylamide hydrogel membrane grafted on

- non-woven polypropylene. *Talanta*, 2014, 121: 256–262
- 12 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
- 13 Vaidya A A, Lele B S, Kulkarni M G, et al. Creating a macromolecular receptor by affinity imprinting. *J Appl Polym Sci*, 2001, 81: 1075–1083
- 14 George M, Abraham T E. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan — A review. *J Controlled Release*, 2006, 114: 1–14
- 15 Zhang F J, Cheng G X, Ying X G. Emulsion and macromolecules templated alginate based polymer microspheres. *React Funct Polym*, 2006, 66: 712–719
- 16 Zhao K, Cheng G, Huang J, et al. Rebinding and recognition properties of protein-macromolecularly imprinted calcium phosphate/alginate hybrid polymer microspheres. *React Funct Polym*, 2008, 68: 732–741
- 17 张闰年, 王蔚, 王春红, 等. 肝靶向海藻酸钠载药纳米粒的细胞毒性研究. *中国科学B辑: 化学*, 2009, 39: 943–949
- 18 Zhao K, Huang J, Ying X, et al. Macromolecularly imprinted calcium phosphate/alginate hybrid polymer microspheres with the surface imprinting of bovine serum albumin in inverse-phase suspension. *J Appl Polym Sci*, 2008, 109: 2687–2693
- 19 Lu L, Qi Y S, Zhou C R, et al. Rapidly *in situ* forming biodegradable hydrogels by combining alginate and hydroxyapatite nanocrystal. *Sci China Technol Sci*, 2010, 53: 272–277
- 20 Herrero E P, Martín Del Valle E M, Peppas N A. Protein imprinting by means of alginate-based polymer microcapsules. *Ind Eng Chem Res*, 2010, 49: 9811–9814
- 21 Bayer C L, Herrero E P, Peppas N A. Alginate films as macromolecular imprinted matrices. *J Biomat Sci Polym E*, 2011, 22: 1523–1534
- 22 傅铁凡, 冯灵智, 赵孔银, 等. TiO₂/海藻酸钙复合膜的制备表征及力学性能. *高分子材料科学与工程*, 2015, 31: 87–90
- 23 Zhao K, Chen T, Lin B, et al. Adsorption and recognition of protein molecular imprinted calcium alginate/polyacrylamide hydrogel film with good regeneration performance and high toughness. *React Funct Polym*, 2015, 87: 7–14
- 24 Alboofetileh M, Rezaei M, Hosseini H, et al. Effect of montmorillonite clay and biopolymer concentration on the physical and mechanical properties of alginate nanocomposite films. *J Food Eng*, 2013, 117: 26–33
- 25 Xie J, Ng W J, Lee L Y, et al. Encapsulation of protein drugs in biodegradable microparticles by co-axial electrospray. *J Colloid Interf Sci*, 2008, 317: 469–476
- 26 Nielsen L, Frokjaer S, Brange J, et al. Probing the mechanism of insulin fibril formation with insulin mutants. *Biochemistry*, 2001, 40: 8397–8409

Preparation and characterization of protein molecular imprinted calcium alginate hydrogel film with controllable thickness

SONG HuanYu¹, ZHAO KongYin^{1,2}, LI SiDi², WEI MengMeng^{1,2}, ZHANG ZhiJian¹, SUN PingPing², ZHUGE Fang² & JIAO Rui²

¹State Key Laboratory of Separation Membranes and Membrane Processes, Tianjin Polytechnic University, Tianjin 300387, China;

²School of Material Science and Engineering, Tianjin Polytechnic University, Tianjin 300387, China

Bovine serum albumin (BSA) imprinted calcium alginate (CaAlg MIP) hydrogel film was prepared using BSA as template molecule, sodium alginate (NaAlg) as the functional monomer, and CaCl₂ as the ionic cross-linker. The thickness of the film was controlled by a glass rod enlaced with brass wires. The relationship between copper wire diameter and the thickness of CaAlg MIP was investigated. SEM, laser scanning confocal microscope and 3D ultra-depth three-dimensional microscope were used to characterize the CaAlg MIP. The mechanical properties of the wet CaAlg MIP prepared with different concentrations of NaAlg were investigated. Circular dichroism (CD) was used to characterize the conformation of the eluted BSA. The influence of different thickness and different eluants on the adsorption capacity of CaAlg MIP was discussed. The results showed that CaAlg MIP adsorbed more BSA than CaAlg NIP. There was no change of the conformation of protein during the preparing and eluting process. The CaAlg MIP can be prepared by a fast, low-cost and environmental friendly method in aqueous solution in the absence of any toxic surfactant or organic solvent, which would find its potential applications in the fields of cell culture and tissue engineering.

calcium alginate hydrogel film, bovine serum albumin, molecular imprinting, adsorption, thickness control

doi: 10.1360/N092016-00154