以多巴胺为功能单体的生物大分子印迹聚合物

李梦圆, 赵慕华, 翟筠秋, 赵美萍*

北京大学化学与分子工程学院, 北京分子科学国家研究中心, 北京 100871

* 联系人, Email: mpzhao@pku.edu.cn

2018-11-07 收稿, 2018-12-15 修回, 2019-01-08 接受, 2019-02-26 网络版发表

国家自然科学基金(21775009)资助

摘要 分子印迹聚合物(molecularly imprinted polymer, MIP)是指功能单体与模板分子组装后发生聚合, 通过移除模板分子得到的聚合物. 与天然抗体相比, MIP具有制备简单、成本低廉、稳定性好、可重复使用等优点, 因此被广泛地用于分离富集、化学传感、药物运输及生物催化等领域. 近年来, 分子印迹技术的发展促进了以生物大分子特别是蛋白质为模板的印迹材料的设计、制备和应用研究. 由于生物相容性好, 聚合反应条件温和且容易调控, 多巴胺被用作功能单体在固体基质表面通过自聚合反应印迹生物大分子. 本文综述这类分子印迹聚合物的设计和制备方法, 并介绍印迹材料的性能表征和应用; 重点论述以蛋白质为模板的印迹聚合物, 同时兼顾以其他生物大分子如多肽、低聚糖以及病毒、酵母细胞等直接作为模板的印迹聚合物的合成和表征; 最后讨论该领域的未来发展趋势和存在的挑战.

关键词 多巴胺自聚, 分子印迹聚合物, 表面印迹, 生物大分子, 蛋白质, 细菌

分子印迹聚合物(molecularly imprinted polymer, MIP)是指功能单体与模板分子通过自组装形成复合物, 在交联剂作用下形成共聚物, 最后通过一定的方法对模板分子进行洗脱, 在聚合物中留下与模板分子在空间结构上匹配并能与之特异性结合的三维空穴^[1,2]. 1972年, Wulff和Sarhan^[3]提出了分子印迹的概念, 并用共价法制备了以糖类化合物为模板分子的分子印迹材料. 1981年, Mosbach课题组^[4,5]提出了非共价作用的印迹体系, 包括离子相互作用、亲疏水相互作用、 π - π 相互作用、静电相互作用, 进一步发展了分子印迹技术, 大大拓宽了该方法的应用范围.

生物大分子, 如蛋白质、多糖、多肽等在生命体系中发挥着至关重要的作用^[6]. 近年来, 纳米技术以及新型印迹方法如表面印迹、表位印迹、印迹后修饰等的发展, 大大促进了以生物大分子特别是蛋白质为模板的

印迹材料的设计、制备和应用研究. 与天然抗体相比, 这类分子印迹聚合物具有制备简单、成本低廉、稳定性好、可重复使用等优点, 因此被广泛地用于分离富集、化学传感、药物运输及生物催化等领域^[7,8].

尽管生物大分子印迹已取得了一定发展, 但制备具有高亲和力和特异性的生物大分子印迹聚合物仍面临一些难题. 例如, 在印迹过程中蛋白类生物大分子易发生构象变化, 最终获得的印迹位点与天然构象之间存在差异. 另外, 由于印迹通常在室温下水溶液中进行, 适合的功能单体种类仍较为有限, 使用较多的功能单体包括丙烯酰胺(AAm), 甲基丙烯酸(MAA), 氨基苯硼酸(APBA), 丙烯酸(AA)和N-异丙基丙烯酰胺(Ni-PAAm)等^[9-12]. 多巴胺(dopamine, DA)是人体内的一种儿茶酚类神经递质^[13,14], 容易发生自聚反应形成聚多巴胺. 该聚合反应的条件十分温和, 在溶解氧以及碱性

引用格式: 李梦圆, 赵慕华, 翟筠秋, 等. 以多巴胺为功能单体的生物大分子印迹聚合物. 科学通报, 2019, 64: 1321-1329

Li M Y, Zhao M H, Zhai J Q, et al. Dopamine-based molecularly imprinted polymers for the recognition of biomacromolecules (in Chinese). Chin Sci Bull, 2019, 64: 1321-1329, doi: [10.1360/N972018-01086](https://doi.org/10.1360/N972018-01086)

图1 由多巴胺-醌和DHI经过共价聚合形成pDA的结构和可能的反应机理^[15]

Figure 1 Structure of pDA formed by covalent polymerization between dopamine-quinone and DHI and the possible reaction mechanism^[15]

条件下,可以在多种材料表面进行,并形成表面含有大量活性官能团的聚合物(图1),为进一步修饰改性提供了条件^[15~18]。聚多巴胺层(polydopamine, pDA)的厚度可以通过溶液酸碱性、聚合时间等进行调控^[15,17],因而近年来,多巴胺的聚合反应不仅被用于纳米材料的表面修饰和改性^[19~22],还被用于制备分子印迹聚合物。本文将综述以多巴胺为功能单体的生物大分子印迹聚合物的设计和制备方法,并介绍相关印迹聚合物的性能表征和应用。重点论述以蛋白质为模板的印迹聚合物,同时兼顾以其他生物大分子如多肽、低聚糖以及病毒、酵母细胞等直接为模板的印迹聚合物的合成和应用。最后讨论该领域的未来发展趋势和有待进一步解决的问题。

1 多巴胺聚合反应

多巴胺聚合反应通常在室温下10 mmol/L Tris缓冲溶液(pH 8.0~8.5)中进行,该反应简单、温和且具有普适性,无需对基底进行修饰,可在几乎所有的无机和有机材料表面自聚成膜,且聚合反应发生后,聚多巴胺膜表面仍然存在大量的邻苯二酚官能团,可以通过与氨基或巯基官能团反应,对膜表面进一步修饰^[13~17,23,24]。关于多巴胺聚合反应的机理尚不明确,亦是该领域研究的热点问题。目前比较一致地认为,聚多巴胺(pDA)形成的初始驱动力是碱性溶液中溶解氧将多巴胺氧化产生多巴胺-醌,该产物通过分子内亲核环化反应生成

5,6-二羟基吲哚(DHI),多巴胺-醌和DHI是形成pDA的主要成分。对后续的反应过程,有三种不同的观点:第一种观点认为二者通过非共价相互作用形成pDA;第二种观点认为二者发生共价聚合形成含有由儿茶酚胺、醌和吲哚重复单元组成的杂聚合物(图1);第三种观点则认为由DHI进一步氧化产生的低聚物结构单元耦合连接形成pDA(图2)。此外,Ryu等人^[15]、Liebscher等人^[25]、Ding等人^[26]、d'Ischia等人^[27]以及Della Vecchia等人^[28]报道吡咯羧酸(PCA)和DHI形成的三聚体复合物(DHI)₂/PCA亦可作为pDA构筑单元。

以多巴胺为单体的印迹反应多发生在固体基质如电极或纳米颗粒等表面。形成的聚多巴胺含有丰富的儿茶酚官能团,在印迹过程中通过静电相互作用、 π - π 相互作用、氢键和共价反应(例如,儿茶酚-NH-R儿茶酚-S-R)等与模板分子相互作用,对其进行特异性识别。研究表明印迹后多巴胺层的厚度与多巴胺浓度、模板分子浓度、载体浓度、pH以及聚合反应时间密切相关。一般的印迹反应中,多巴胺浓度多控制在0.1~10 mg/mL,反应pH为8.0~8.5的Tris缓冲溶液,反应时长为3~24 h, pDA层厚度为几到几十纳米不等。较低浓度的DA可有效减少聚多巴胺颗粒的形成,并避免颗粒间聚集。Ball等人^[17]系统研究了体系中无模板分子时pDA沉积动力学随反应pH和DA浓度的变化关系。另外,有研究发现对于固体表面的多巴胺聚合反应,一些蛋白质的存在会调控反应动力学并减慢聚合反应^[29]。

图2 (网络版彩色)多巴胺氧化产物醌及其成环产物、进一步氧化产物吲哚和吲哚醌的结构(a)和目前已报道的pDA结构模型(b)^[25,26]

Figure 2 (Color online) Oxidation products of dopamine (a) and proposed model structures of pDA (b). I: pDA structure formed via DHI polymerization; II: pDA structure consisted of various indole units; III: pDA formed by supramolecular aggregation of DHI and its dione derivative; IV: self-assembled trimer of (DA)₂/DHI found in pDA; V-1 and V-2: pyrrolecarboxylic acids (PCA) moieties recognized in pDA; VI: (DHI)₂/PCA trimer complex formed in pDA film)^[25,26]

2 印迹蛋白分子

与传统的体相印迹材料相比,表面印迹材料的印迹位点可及性和传质速率更好,可实现对模板分子的快速识别,因此常被用于印迹生物大分子^[30].磁纳米颗粒由于具有良好的生物相容性和易于在磁场下分离等特点,被广泛用于生物大分子特别是蛋白质的表面印迹^[31~33].此外,碳纳米管^[33~35]、SiO₂纳米颗粒^[36,37]、金纳米颗粒^[38,39]等纳米材料具有各自独特的物理化学性质,亦被用作印迹的固体基质构建识别传感元件.本文将多巴胺为单体印迹蛋白的工作分两部分介绍:第一部分介绍以常见蛋白如人/牛血清蛋白(HSA/BSA)、溶菌酶(Lyz)、血红蛋白(hemoglobin, Hb)、胰蛋白酶(trypsin)和免疫球蛋白(IgG)等作为模板蛋白开展的印迹工作;第二部分介绍以糖蛋白作为模板蛋白的印迹工作,这类工作中模板蛋白通过特定方法先被固定在载体上,然后与多巴胺自组装进行印迹.

2.1 印迹模板蛋白(HSA, BSA, IgG, Lyz, Hb等)

2009年, Zhou等人^[31]报道在磁纳米颗粒表面印迹

人血红蛋白,印迹因子可达4.5,且材料在竞争蛋白存在条件下能吸附80%的模板蛋白,具有较好的选择性.2012年, Zhang等人^[32]通过水热法合成羧基修饰的磁纳米颗粒(Fe₃O₄ NPs),然后以溶菌酶为模板蛋白,在其表面进行印迹反应.他们通过改变Fe₃O₄ NPs和多巴胺的质量比来控制pDA层厚度,并发现材料的最大吸附容量与pDA层的厚度密切相关.当pDA厚度由15 nm增加到40 nm时,材料的最大吸附容量在30 nm时达到最大值.随后, Gao等人^[33]则在氨基修饰的磁纳米颗粒表面印迹BSA,并系统研究了印迹因子随DA用量的变化规律.此外,竞争吸附实验证明该印迹材料对模板蛋白具有良好的选择性.随着研究工作的发展,蛋白质印迹不再仅仅是局限于印迹方法验证,研究者开始将材料用于实际样品的分析应用.比如, Gao等人^[34]在修饰Fe₃O₄@NH₂纳米颗粒的碳纳米管表面印迹溶菌酶,并用该材料将其从鸡蛋清中成功分离.而Xu等人^[35]也在多壁碳纳米管表面成功印迹溶菌酶,该材料也可从鸡蛋清充分分离Lyz,并可重复使用6次,吸附容量仍无明显降低. Xia等人^[36]在二氧化硅纳米粒子表面成功印迹了牛血红蛋白(BHb),不仅通过一系列表征方法如电子显微

镜、红外、热重分析等研究了印迹材料的性质, 还通过单独和竞争吸附实验证明印迹材料的选择性. 最后, 他们还成功将该材料用于识别和分离牛全血样品中的BHb. 这对于检测生物样品中的疾病标志物(多为低丰度蛋白)具有重要意义, 因高丰度蛋白经常干扰其信号. Nematollahzadeh等人^[37]在球形多孔固体载体孔隙表面以HSA为模板印迹pDA层后, 将其作为液相色谱的固定相用于将HSA与BSA和IgG分离. 该固定相可被重复使用18次, 仍然保持良好的分离效果. 印迹材料上的模板蛋白HSA可通过0.5 mol/L NaCl溶液洗脱下来.

除了用于蛋白质的分离、提纯和富集外, 印迹技术还提供了一种新的纳米颗粒表面修饰改性的方法, 拓宽了纳米颗粒的应用范围. 例如, Tretjakov等人^[38]利用电化学沉积方法在金电极表面印迹IgG后, 利用石英晶体微天平(QCM)实现对IgG的无标记实时检测. 首先, 用4-氨基苯酚修饰QCM金电极, 然后利用3,3'-二硫代双(磺酸琥珀酰亚氨基丙酸酯)(DTSSP)将IgG固定在金电极表面, 加入多巴胺后进行电化学沉积. 循环伏安法(CV)和电化学阻抗谱(EIS)用来监控每一步修饰后金电极表面的变化; 而电化学QCM用于监测多巴胺聚合过程中的重量变化. 印迹结束后, 用含有0.1% SDS的3 mol/L的氯化钠溶液除去模板分子, 即得到表面有特异性识别位点的QCM传感器. 通过QCM-FIA法研究材料对IgG和IgA的识别, 发现当pDA层厚度超过8.8 nm时, 印迹材料对模板蛋白具有较好的亲和性, 且在其厚度达到17.7 nm时, 印迹效应最明显. 可能的原因是, 在该厚度下, IgG分子恰好能够被限制在聚合物中形成特异性集结合位点. 当厚度继续增加超过固定后IgG的高度(18 nm)时, 聚合物膜表面印迹位点减少, 印迹效应下降. 印迹位点和蛋白之间的亲和作用常数 K_d 为296 nmol/L. 这一研究展示了分子印迹在构造生物传感方面的应用价值. 随后亦有类似的工作展开^[39].

由于磁纳米颗粒易聚集且分散性不好, 一些课题组通过在其表面修饰介孔硅, 既提高了分散性, 也利于表面官能团修饰. Wan等人^[40]首次将MIP材料用于基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)分析中目标蛋白的选择性富集. 他们以溶菌酶(Lyz)为模板蛋白在 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ 纳米颗粒表面印迹得到pDA层, 高分辨电子显微镜表明pDA厚度为20 nm, 并通过热重以及红外证明pDA层印迹成功. 结合实验表明, 材料的印迹因子为2.04, 材料对模板的选择性来自于二者之间的多重弱相互作用以及互补的立体构型. 作者将该印

迹材料与蛋白质混合液(Cyt C, RNase A, Lyz和trypsin)孵育, 用2%乙腈(ACN)/0.1% 三氟乙酸(TFA)洗去非特异吸附蛋白, 并用30% ACN/0.1% TFA洗脱模板蛋白后, 用MALDI-TOF MS分析(图3(a)). 结果表明, MIP材料处理后Lyz的MS信号显著增强, 而其他蛋白信号降低或消失, 证明该印迹材料可选择性富集纯化蛋白混合液中的目标蛋白. 此外, 该材料还能从稀释后的蛋清样品中富集纯化Lyz(图3(b)). 最近, Chen等人^[41]先用羧基修饰 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{fibrous SiO}_2$, 然后在其表面对Lyz进行印迹, 得到了 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{fibrous SiO}_2/\text{pDA}$ 纳米颗粒(图S1). 他们通过等温滴定量热法(ITC)研究 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{fibrous SiO}_2/\text{pDA}$ 和Lyz之间的相互作用, 结果证明印迹后的微球与Lyz的亲合常数是而非印迹材料的100倍. 随后, 通过MTT实验证明在浓度为50~500 $\mu\text{g/mL}$ 范围内, 印迹材料具有良好的生物相容性. 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-Page)和MALDI-TOF MS实验则表明, 印迹材料可有效分离出鸡蛋清中的Lyz. 最后, 作者

图3 蛋白质溶液的MALDI-TOF MS图. (a) 蛋白质混合液(100 $\mu\text{g/mL}$ Cyt C+200 $\mu\text{g/mL}$ RNase A+200 $\mu\text{g/mL}$ Lyz+400 $\mu\text{g/mL}$ trypsin)与Lyz-MIP孵育后在不同洗脱条件下的洗脱液; (b) 用Lyz-MIP富集处理前后的蛋清样品稀释液^[40]

Figure 3 MALDI-TOF MS data of spiked protein mixture (100 $\mu\text{g/mL}$ Cyt C+200 $\mu\text{g/mL}$ RNase A+200 $\mu\text{g/mL}$ Lyz+400 $\mu\text{g/mL}$ trypsin) (a) and diluted egg white samples (b)^[40]

研究了印迹材料对模板蛋白的捕获和近红外光控制的可控释放。由于pDA具有很宽的吸收范围和光热效应,在近红外光照射下,pDA吸收近红外光将其转化为热量,体系的温度迅速从26升高到38℃,引起溶菌酶从 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{fibrous SiO}_2@\text{pDA}$ 印迹微球表面的释放。与大肠杆菌的共孵育实验表明从印迹微球表面释放的Lyz可有效溶解大肠杆菌细胞壁,破坏其形态。

最近,为开发急性心肌梗塞(AMI)的便携式快速检测装置,Palladino等人^[42]开发了一种用于检测心肌肌钙蛋白T(TNT)的生物传感器。利用表位印迹法,他们以TNT不同肽段为模板,在表面等离子体共振(SPR)芯片上进行印迹,移除模板后得到MIP-TNT,通过检测MIP-TNT对TNT以及HSA的响应来判断印迹是否成功,最后确定以碳端肽段为模板印迹的传感器选择性最好。研究表明,模板的侧链基团、连接特点、亲水性和长度等对印迹效果有很大影响。

2.2 印迹糖蛋白

糖蛋白在许多生物过程中发挥重要作用,对糖蛋白的分析有助于发现潜在的生物标志物^[43]。质谱是一种强有力的分析糖蛋白的工具,但不能在没有任何样品预处理的情况下鉴定生物样品中的糖蛋白。常用于糖蛋白分离富集的方法包括凝集素亲和层析、亲水相互作用色谱、酰肼化学和硼酸盐亲和色谱^[44,45],虽然已取得一些成果,但仍迫切需要发展高效率的亲亲和富集方法。

Lin等人^[46]于2013年首次报道了分子印迹整体柱用于分离糖蛋白。首先在乙烯基硅烷化试剂处理后的毛细管内以4-乙烯基苯硼酸(VPBA)为单体,季戊四醇三丙烯酸酯(PETA)为交联剂,乙二醇和环己醇作为致孔剂制备聚合物整体柱。然后利用硼亲和反应,将辣根过氧化物酶(HRP)固定在柱表面进行印迹,12 h后,利用含有50%ACN的50 mmol/L乙酸(HAc, pH 3.6)溶液洗涤移除HRP。他们先使用儿茶酚和喹啉(作为阴性对照)作为模型化合物评估印迹整体柱的性能,并优化洗脱条件。然后,将其用于分离富集加标后人血清中的HRP。在另一工作中,Sun等人^[47]利用硼酸官能化的 SiO_2 纳米粒子作为基底印迹HRP,并研究了印迹材料的吸附性质。与上述反应不同的是,他们利用“硫醇-烯”点击反应将硼酸基团固定在 SiO_2 表面,该方法可避免利用乙烯基硼酸的自聚合反应,改善其对模板的定向组装和识别能力。

Qu等人^[48]合成了基于凝集素识别的糖蛋白表面印

迹聚合物,该印迹聚合物可在生理环境下选择性提取糖蛋白,且洗脱后仍保持蛋白活性。在该工作中,他们首先在羧基磁球表面修饰甘露糖(Mannose),利用伴刀豆球蛋白A(Con A)能够特异性结合单糖、多糖以及含有糖单元的糖蛋白(结合比为1:4),可通过自组装将Con A固定在磁球表面(图S2)。然后,利用相同的凝集素-糖相互作用将模板蛋白(转铁蛋白,TRF)预固定在磁球表面,进而通过多巴胺自聚反应对模板进行印迹。该印迹反应在pH 7.4的PBS中进行,为改善聚合速度,在反应体系中连续鼓入氧气。在研究中发现,利用硼酸盐缓冲液可以将转铁蛋白进行活性洗脱,同时亦可保护固定在磁球表面的伴刀豆球蛋白A。结合实验表明印迹材料($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TRF-MIPs}$)对模板蛋白的结合亲和力具有pH依赖性,在中性pH下印迹材料的吸附容量和印迹因子达到最大值,这可能是因为印迹材料的制备在pH 7.4进行,生成的印迹位点被认为与pH 7.4下的TRF蛋白的构象和表面电荷最匹配。当TRF溶解在较高或较低pH溶液中时,其构象和表面电荷可能会发生变化,导致其与印迹位点的结合能力降低。为定量描述印迹磁球的结合性能,用Langmuir-Freundlich吸附方程拟合吸附等温线, $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TRF-MIPs}$ 对模板的吸附常数为30.38 mL/mg,IF为2.76。

3 印迹病毒(virus)或细菌(bacteria)

近年来分子印迹技术还被拓展应用于生物物种如病毒、细菌等的印迹,以此构建的印迹材料可用于病毒或细菌检测,预防病毒感染等。理论上讲,病毒和细菌是理想的印迹模板,因其表面存在多种蛋白质与DA相互作用。Liang等人^[49]将表面印迹技术和电位分析法相结合发展了一种通用、简便地用于生物分析物的无标记电位传感策略。其原理如图4(a)所示,当待分析物在聚合膜电位计的印迹表面被识别结合后,会阻止指示剂离子以离子传递的方式从识别层(imprinted layer)进入转导层(ISE-membrane),从而诱导电位变化,该变化可用作分析信号以确定样品中待分析物的浓度。具体检测流程如图4(b)所示,印迹修饰后的电位传感器与样品孵育一段时间后,用去离子水冲洗以避免非特异性吸附;然后将其转移到含有指示离子的电化学电池中,在待分析物和指示剂离子共存的条件下进行电位测定。作者先以胰蛋白酶(trypsin)为模板蛋白,通过优化指示剂浓度、阳极电流幅度和持续时间、表面印迹时间以及洗脱液中乙酸浓度等,建立了电位变化与胰

图4 (网络版彩色)多巴胺表面印迹修饰电位传感器的构造示意图(a)和计时电位计检测生物分析物(b)^[49]
 Figure 4 (Color online) Schematic illustration of the construction of mussel-inspired surface imprinted-layer-modified potentiometric sensor (a) and the chronopotentiometric detection of a bioanalyte (b)^[49]

蛋白酶浓度的线性关系, 其线性范围为0.08~4.0 U/mL, 并通过使用其他蛋白如牛血清蛋白、辣根过氧化物酶等验证电位传感器的选择性. 最后, 他们将该方法拓展至酵母细胞的检测, 其线性响应的浓度范围为100~1500 CFU/mL, 检测限为50 CFU/mL, 该检测限低于基于PCR的传统方法的检测限.

Chen等人^[50]发展了一种基于多巴胺表面印迹和氮掺杂石墨烯量子点(N-GQD)的电化学发光(ECL)生物传感器用于大肠杆菌O157:H7的定量检测. 多巴胺和靶细菌直接在电极上电聚合印迹, 除去大肠杆菌O157:H7模板后, 建立的PDA-SIP即可选择性识别大肠杆菌O157:H7. 然后用N-GQD标记大肠杆菌O157:H7的多克隆抗体(pAb), 大肠杆菌O157:H7/pAb-N-GQDs在加入 $K_2S_2O_8$ 后可产生强的电化学荧光. 优化检测条件后, 该方法的线性范围为 10^{-10} ~ 10^{-7} CFU/mL, 检测限为8 CFU/mL, 且水样中大肠杆菌O157:H7的加标定量回收率为99.4%~102%. Yang等人^[51]报道了能特异性识别甲型肝炎病毒(HAV)的共振光散射(RLS)传感器. 该传感器通过在 SiO_2 纳米颗粒表面印迹全病毒HAV, 当HAV被印迹后的 SiO_2 纳米颗粒捕获后, RLS增强, 采用简单的荧光光度计测量强度的变化, 与HAV的浓度成正比, 其线性范围是0.04~6.0 nmol/L. Li等人^[52]首次报道了可用于抗病毒感染的病毒印迹聚合物. 他们以病毒为模板, 在pDA修饰的硅球表面印迹全病毒. 通过斑块实验验证, 印迹材料可选择性抑制复杂培养基中目标病毒, 且抗感染能力与印迹材料用量和时间具有相关性. 当印迹材料与病毒和宿主细胞一起孵育时, 印迹材料可快速和选择性吸附模板病毒阻止其感染宿主细胞(12 h内). 作者还

通过实验证明印迹材料具有生物相容性, 并且具有出色的稳定性和可重复使用性. 此外, 使用不同病毒作为模板制备的印迹材料显示出类似的抗病毒感染特性.

本文涉及的相关文献中模板、功能单体、印迹条件以及印迹材料表征参数等信息总结于表S1.

4 总结和展望

综上所述, 因其水溶性好、聚合反应条件温和等特性, 多巴胺作为功能单体用于生物大分子印迹聚合物的制备得到了很多关注, 并在生物大分子识别、分离富集、检测以及抗病毒感染等方面取得了一些进展. 多巴胺上的氨基和儿茶酚基团可以通过非共价相互作用如氢键, 离子键和 π - π 相互作用等与生物大分子相互作用, 并通过印迹过程将这些作用协同固定下来, 形成具有一定选择性和特异性的识别位点. 此外, 聚多巴胺印迹材料的生物相容性较好, 同时具备光热转化性质, 因此可将这类材料应用于细胞成像、药物输送、癌症治疗等.

该领域目前的挑战之一是聚多巴胺表面的官能团密度大且种类单一, 导致聚多巴胺分子印迹材料的非特异性吸附问题较为突出, 而对模板分子的亲和力相对较弱. 针对这一挑战, 未来的研究可尝试开发和利用多巴胺的各种衍生物, 引入更加多样化的官能团; 还可采用对pDA印迹层进行印迹后修饰的方法, 减少非特异性吸附, 提高材料的选择性. 此外, 多巴胺聚合过程中的中间产物与模板蛋白之间的相互作用值得进一步深入研究, 可以提供更多的调控手段, 有助于获得性能更好的生物大分子的印迹聚合物.

参考文献

- 1 Whitcombe M J, Chianella I, Larcombe L, et al. The rational development of molecularly imprinted polymer-based sensors for protein detection. *Chem Soc Rev*, 2011, 40: 1547–1571
- 2 Cutivet A, Schembri C, Kovensky J, et al. Molecularly imprinted microgels as enzyme inhibitors. *J Am Chem Soc*, 2009, 131: 14699–14702
- 3 Wulff G, Sarhan A. Use of Polymers with enzyme-analogous structures for resolution of racemates. *Angew Chem Int Ed*, 1972, 11: 341–345
- 4 Andersson L, Sellergren B, Mosbach K. Imprinting of amino acid derivatives in macroporous polymers. *Tetrahedron Lett*, 1984, 25: 5211–5214
- 5 Vlatakis G, Andersson L I, Müller R, et al. Drug Assay Using Antibody mimics made by molecular imprinting. *Nature*, 1993, 361: 645–647
- 6 Pecuh M W, Hamilton A D. Peptide and protein recognition by designed molecules. *Chem Rev*, 2000, 100: 2479–2494
- 7 Yoshikawa M, Tharpa K, Dima Ş O. Molecularly imprinted membranes: Past, present, and future. *Chem Rev*, 2016, 116: 11500–11528
- 8 Chen L, Wang X, Lu W, et al. Molecular imprinting: Perspectives and applications. *Chem Soc Rev*, 2016, 45: 2137–2211
- 9 Yang K, Li S, Liu J, et al. Multiepitope templates imprinted particles for the simultaneous capture of various target proteins. *Anal Chem*, 2016, 88: 5621–5625
- 10 Duan H, Li L, Wang X, et al. Biorecognition and highly sensitive determination of Ribonuclease A with chemiluminescence sensor based on Fe₃O₄/multi-walled carbon nanotubes/SiO₂-surface molecular imprinting polymer. *RSC Adv*, 2015, 5: 18850–18857
- 11 Yoshimatsu K, Yamazaki T, Hoshino Y, et al. Epitope discovery for a synthetic polymer nanoparticle: A new strategy for developing a peptide tag. *J Am Chem Soc*, 2014, 136: 1194–1197
- 12 Liu L, Zhong T, Xu Q, et al. Efficient molecular imprinting strategy for quantitative targeted proteomics of human transferrin receptor in depleted human serum. *Anal Chem*, 2015, 87: 10910–10919
- 13 Schultz W, Dayan P, Montague P R. A neural substrate of prediction and reward. *Science*, 1997, 275: 1593–1599
- 14 Miller E K, Cohen J D. An integrative theory of prefrontal cortex function. *Annu Rev Neurosci*, 2001, 24: 167–202
- 15 Ryu J H, Messersmith P B, Lee H. Polydopamine surface chemistry: A decade of discovery. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2018, 10: 7523–7540
- 16 Dreyer D, Miller D J, Freeman B D, et al. Elucidating the structure of poly (dopamine). *Langmuir*, 2012, 28: 6428–6435
- 17 Ball V, Del Frari D, Toniazzo V, et al. Kinetics of polydopamine film deposition as a function of pH and dopamine concentration: Insights in the polydopamine deposition mechanism. *J Colloid Interface Sci*, 2012, 386: 366–372
- 18 Lee H, Dellatore S M, Miller W M, et al. Mussel-inspired surface chemistry for multifunctional coatings. *Science*, 2007, 318: 426–430
- 19 Xu C, Xu K, Gu H, et al. Dopamine as a robust anchor to immobilize functional molecules on the iron oxide shell of magnetic nanoparticles. *J Am Chem Soc*, 2004, 126: 9938–9939
- 20 E S, Shi L, Guo Z. Self-assembly and tribological properties of a novel organic-inorganic nanocomposite film on silicon using polydopamine as the adhesion layer. *RSC Adv*, 2014, 4: 948–953
- 21 Luczak T. Highly selective voltammetric sensing of paracetamol on nanogold modified electrode in the presence of interfering compounds. *New J Chem*, 2017, 41: 5713–5722
- 22 Medintz I L, Stewart M H, Trammell S A, et al. Quantum-dot/dopamine bioconjugates function as redox coupled assemblies for *in vitro* and intracellular pH sensing. *Nat Mater*, 2010, 9: 676–684
- 23 Ye Q, Zhou F, Liu W. Bioinspired catecholic chemistry for surface modification. *Chem Soc Rev*, 2011, 40: 4244–4258
- 24 Liu Y, Ai K, Lu L. Polydopamine and its derivative materials: Synthesis and promising applications in energy, environmental, and biomedical fields. *Chem Rev*, 2014, 114: 5057–5115
- 25 Liebscher J, Mrowczynski R, Scheidt H A, et al. Structure of polydopamine: A never-ending story? *Langmuir*, 2013, 29: 10539–10548
- 26 Ding Y H, Floren M, Tan W. Mussel-inspired polydopamine for bio-surface functionalization. *Biosurf Biotribol*, 2016, 2: 121–136
- 27 d’Ischia M, Napolitano A, Ball V, et al. Polydopamine and eumelanin: From structure-property relationships to a unified tailoring strategy. *Acc Chem Res*, 2014, 47: 3541–3550
- 28 Della Vecchia N F, Avolio R, Alfè M, et al. Building-block diversity in polydopamine underpins a multifunctional eumelanin-type platform tunable through a quinone control point. *Adv Funct Mater*, 2013, 23: 1331–1340
- 29 Chassepot A, Ball V. Human serum albumin and other proteins as templating agents for the synthesis of nanosized dopamine-eumelanin. *J Colloid Interface Sci*, 2014, 414: 97–102
- 30 Verheyen E, Schillema J P, van Wijk M, et al. Challenges for the effective molecular imprinting of proteins. *Biomaterials*, 2011, 32: 3008–3020
- 31 Zhou W H, Lu C H, Guo X C, et al. Mussel-inspired molecularly imprinted polymer coating superparamagnetic nanoparticles for protein recognition. *J Mater Chem*, 2010, 20: 880–883
- 32 Zhang M, Zhang X, He X, et al. A self-assembled polydopamine film on the surface of magnetic nanoparticles for specific capture of protein. *Nanoscale*, 2012, 4: 3141–3147

- 33 Gao R, Zhang L, Hao Y, et al. Specific removal of protein using protein imprinted polydopamine shells on modified amino-functionalized magnetic nanoparticles. *RSC Adv*, 2014, 4: 64514–64524
- 34 Gao R, Zhang L, Hao Y, et al. Novel polydopamine imprinting layers coated magnetic carbon nanotubes for specific separation of lysozyme from egg white. *Talanta*, 2015, 144: 1125–1132
- 35 Xu X, Guo P, Luo Z, et al. Preparation and characterization of surface molecularly imprinted films coated on multiwall carbon nanotubes for recognition and separation of lysozyme with high binding capacity and selectivity. *RSC Adv*, 2017, 7: 18765–18774
- 36 Xia Z, Lin Z, Xiao Y, et al. Facile synthesis of polydopamine-coated molecularly imprinted silica nanoparticles for protein recognition and separation. *Biosens Bioelectr*, 2013, 47: 120–126
- 37 Nematollahzadeh A, Shojaei A, Abdekhodaie M J, et al. Molecularly imprinted polydopamine nano-layer on the pore surface of porous particles for protein capture in HPLC column. *J Colloid Interface Sci*, 2013, 404: 117–126
- 38 Tretjakov A, Syritski V, Reut J, et al. Surface molecularly imprinted polydopamine films for recognition of immunoglobulin G. *Microchim Acta*, 2013, 180: 1433–1442
- 39 Li L, Fan L, Dai Y, et al. Recognition and determination of bovine hemoglobin using a gold electrode modified with gold nanoparticles and molecularly imprinted self-polymerized dopamine. *Microchim Acta*, 2015, 182: 2477–2483
- 40 Wan W, Han Q, Zhang X, et al. Selective enrichment of proteins for maldi-tof ms analysis based on molecular imprinting. *Chem Commun*, 2015, 51: 3541–3544
- 41 Chen J, Lei S, Xie 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
- 42 Palladino P, Minunni M, Scarano S. Cardiac Troponin T capture and detection in real-time via epitope-imprinted polymer and optical biosensing. *Biosens Bioelectr*, 2018, 16: 93–98
- 43 Krishnamoorthy L, Mahal L K. Glycomic analysis: An array of technologies. *ACS Chem Biol*, 2009, 4: 715–732
- 44 Li Y, Shah P, De Marzo A M, et al. Identification of glycoproteins containing specific glycans using a lectin-chemical method. *Anal Chem*, 2015, 87: 4683–4687
- 45 Lin Z, Pang J, Yang H, et al. One-pot synthesis of an organic-inorganic hybrid affinity monolithic column for specific capture of glycoproteins. *Chem Commun*, 2011, 47: 9675–9677
- 46 Lin Z, Wang J, Tan X, et al. Preparation of boronate-functionalized molecularly imprinted monolithic column with polydopamine coating for glycoprotein recognition and enrichment. *J Chromatogr A*, 2013, 1319: 141–147
- 47 Sun L, Lin D, Lin G, et al. Click synthesis of boronic acid-functionalized molecularly imprinted silica nanoparticles with polydopamine coating for enrichment of trace glycoproteins. *Anal Methods*, 2015, 7: 10026–10031
- 48 Qu X, Wang F, Sun Y, et al. Selective extraction of bioactive glycoprotein in neutral environment through concanavalin a mediated template immobilization and dopamine surface imprinting. *RSC Adv*, 2016, 6: 86455–86463
- 49 Liang R, Ding J, Gao S, et al. Mussel-inspired surface-imprinted sensors for potentiometric label-free detection of biological species. *Angew Chem Int Ed*, 2017, 56: 6833–6837
- 50 Chen S, Chen X, Zhang L, et al. Electrochemiluminescence detection of *Escherichia coli* o157:H7 based on a novel polydopamine surface imprinted polymer biosensor. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2017, 9: 5430–5436
- 51 Yang B, Gong H, Chen C, et al. A virus resonance light scattering sensor based on mussel-inspired molecularly imprinted polymers for high sensitive and high selective detection of hepatitis a virus. *Biosens Bioelectr*, 2017, 87: 679–685
- 52 Li N, Liu Y J, Liu F, et al. Bio-inspired virus imprinted polymer for prevention of viral infections. *Acta Biomater*, 2017, 51: 175–183

补充材料

表S1 已报道的印迹反应的条件参数以及印迹材料表征参数

图S1 溶菌酶印迹微球制备方法的示意图

图S2 由伴刀豆球蛋白A(Con A)介导的模板固定及转铁蛋白的原位表面印迹

本文以上补充材料见网络版csb.scichina.com. 补充材料为作者提供的原始数据, 作者对其学术质量和内容负责。

Summary for “以多巴胺为功能单体的生物大分子印迹聚合物”

Dopamine-based molecularly imprinted polymers for the recognition of biomacromolecules

Mengyuan Li, Muhua Zhao, Junqiu Zhai & Meiping Zhao*

Beijing National Laboratory for Molecular Sciences, College of Chemistry and Molecular Engineering, Peking University, Beijing 100871, China

*Corresponding author, E-mail: mpzhao@pku.edu.cn

Compared to natural antibodies or receptors, molecularly imprinted polymers (MIPs) have shown advantages of easy preparation, low cost, high stability and reusability. MIPs have been widely used in the fields of separation, chemical sensing, drug delivery and biocatalysis. The development of new imprinting methods such as surface imprinting, epitope imprinting, post-imprinting modification have promoted the synthesis and application of MIPs against biomacromolecules. Despite of the success, it remains a challenge to prepare MIPs with high affinity and specificity to the target proteins because the options of water-soluble monomers are very limited and the protein's conformation is liable to change during the polymerization reaction. The majority of protein imprinting studies employ the five most common monomers: acrylamide (AAm), methacrylic acid (MAA), aminophenylboronic acid (APBA), acrylic acid (AA), and N-isopropylacrylamide (NiPAAm) and the two frequently used crosslinkers, methylenebisacrylamide (MBA) and ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA) for preparation of protein imprinted polymers. In recent years, dopamine (DA) has been frequently used for surface modification as it can self-polymerize in alkaline medium at room temperature and generate polydopamine (pDA) films that can adhere onto almost all inorganic and organic surfaces with good biocompatibility. Thus, DA emerged as an appropriate monomer as well as a crosslinker for various imprinting reactions. In this review, we highlighted the recent advances in design and fabrication of DA-based MIPs for various biomacromolecules, including proteins, glycoproteins, bacteria or virus, with focus on protein imprinted polymers. First, we briefly introduced the DA self-polymerization reaction and the reported mechanisms for pDA formation. It is generally accepted that the initial driving force for the formation of pDA is the oxidation of DA to DA-indole by dissolved oxygen in an alkaline solution. Then, we summarized the recent work that employs common protein such as human/bovine serum albumin (HSA/BSA), lysozyme (Lyz), hemoglobin, trypsin and immunoglobulin (IgG) as the imprinting templates. These MIPs were mainly used for separation and purification of the template proteins. We also introduced the combination of protein imprinting with quartz crystal microbalance (QCM), cyclic voltammetry (CV), surface plasmon resonance (SPR) and mass spectroscopy (MS) for recognition and detection of the target proteins. In the following part, we summarized the strategies developed for imprinting of glycoproteins, most of which took advantage of boron affinity reaction or lectin-sugar interaction to improve the affinity and selectivity of the resultant MIPs. Then, we introduced recent work on imprinting of microorganisms such as viruses and bacteria, in which surface imprinting technique and potential analysis or chemiluminescence (ECL) technique are combined to construct biosensors that can selectively detect target species with high sensitivity. In addition, we also introduced the synthesis of a bio-inspired virus imprinted polymer and its application for prevention of viral infections. The techniques which were used for characterizing the properties of the MIP materials, e.g., adsorption capacity, imprinting factor and selectivity, as well as the proposed theoretical model were also mentioned in the review. Finally, we discussed current challenges and possible solutions for using DA as a monomer to prepare MIPs for biomacromolecules. We believe that the interactions between the intermediate products during dopamine polymerization and the template proteins deserve further investigation, as it may provide more possibilities to modulate the binding properties of the obtained MIPs.

dopamine self-polymerization, molecularly imprinted polymer, surface imprinting, biomacromolecule, protein, bacteria

doi: [10.1360/N972018-01086](https://doi.org/10.1360/N972018-01086)