硼亲和可控定向表面分子印迹技术研究进展

王双寿^{1*}, 卢小媚², 程婕¹, 葛琼琼¹

1. 安徽工业大学化学与化工学院, 马鞍山 243032;

2. 南京医科大学附属明基医院, 南京明基医院心血管内科, 南京 210019

* 联系人, E-mail: wangss17@ahut.edu.cn

2018-10-11 收稿, 2018-12-25 修回, 2018-12-28 接受, 2019-02-13 网络版发表

安徽工业大学人才项目(DT18100003)、安徽工业大学青年基金(RD18100229)和南京大学生命分析化学国家重点实验室开放研究基金(SKLACLS1801)资助

摘要 分子印迹是一项模拟靶向生物分子特异性识别能力的仿生分子识别技术, 因其识别选择性好、制备简单、价格低廉等优势而被广泛应用. 发展至今, 已有多种先进的印迹方法被报道, 包括表面印迹、表位印迹、乳液印迹等, 克服了传统本体印迹方法中存在的许多问题, 也使分子印迹技术在许多应用领域成为理想的抗体替代品. 由于糖抗体极为稀缺, 因此发展出针对糖类化合物的分子印迹技术显得尤为重要, 而硼亲和可控定向表面分子印迹技术的提出为解决该问题提供了极有力的技术支持. 该技术是一项可控、通用、高效的分子印迹技术, 几乎适用于各种类型的基质材料和所有糖类化合物的印迹. 它的提出不仅进一步丰富了分子印迹技术的应用范围, 更是从方法学上将分子印迹技术推向了一个新的高度, 因此具有重要的现实与科学意义. 本文介绍了硼亲和可控定向表面分子印迹技术的主要制备方法、原理、应用及其最新研究进展, 提出了该技术目前存在的若干问题并展望其未来可能的发展方向.

关键词 硼亲和, 分子印迹, 仿生分子识别, 细胞成像, 糖蛋白, 癌症

分子印迹技术^[1-3]是一项模拟抗原-抗体、酶-底物等特异性识别作用的仿生分子识别技术. 其制备过程是将模板分子、功能单体、交联剂、致孔剂等混合后在一定条件下进行聚合, 形成包裹模板分子在内的聚合物, 然后通过适当方式去除模板分子, 即得到分子印迹聚合物(MIPs). MIPs有着与模板分子三维尺寸和形状相匹配的印迹空腔, 能与模板分子选择性结合. 相比抗体等具有特异性识别能力的生物分子而言, MIPs不仅有着良好的靶向识别能力, 还有着更多独特的优势, 如预定性强、稳定性好、制备简单、成本低廉等, MIPs也因此有着“人工抗体”的美誉. 因为这些独特的优势, MIPs已被广泛应用于化学分离^[4,5]、传感^[6,7]、催化^[8]、疾病诊断^[9]、药物递送^[10,11]、细胞与活体分

析^[12-14]等领域.

经过几十年的发展, 已有多种分子印迹技术被报道, 如本体印迹^[15]、表面印迹^[16]、表位印迹^[17]以及乳液印迹^[18,19]等. 然而, 尽管分子印迹方法种类多样, 但绝大多数印迹方法可控性差, 印迹效率不高, 且适用于不同模板分子和基质的通用型印迹技术极为有限, 因而一定程度地限制了分子印迹技术的发展与应用.

刘震课题组^[20-22]提出的硼亲和可控定向表面分子印迹技术将硼亲和作用与分子印迹技术有效结合, 不仅印迹效率高、通用性好, 还具有亲和力高、抗干扰能力强、适用pH范围宽、质谱兼容性好等优点, 在糖类化合物的分离和检测^[20,23]、酶活性分析^[24]、疾病诊断^[25]以及细胞与活体分析^[26-29]等领域有着重要应用.

引用格式: 王双寿, 卢小媚, 程婕, 等. 硼亲和可控定向表面分子印迹技术研究进展. 科学通报, 2019, 64: 1340-1351

Wang S S, Lu X M, Cheng J, et al. Advance in boronate affinity-based controllable oriented surface imprinting (in Chinese). Chin Sci Bull, 2019, 64: 1340-1351, doi: 10.1360/N972018-01009

该技术的制备原理如图1所示, 印迹过程主要通过模板固定、定向印迹和模板移除3步来实现。模板固定是指模板分子通过硼亲和和作用固定在基质表面(模板分子的顺式二羟基与基质表面的硼酸官能团之间可逆共价形成硼酸酯); 定向印迹是指在固定过模板分子的基质表面聚合一层印迹层, 并根据模板分子的尺寸定制印迹层厚度; 模板移除是指通过合适的手段(常用弱酸性条件, 是否添加表面活性剂依模板分子性质而定)将模板分子洗脱, 在印迹层上形成与模板分子三维尺寸相匹配的印迹空腔。该技术具备两大重要特征, 即可控性和通用性。可控性体现在印迹聚合物层的厚度能准确控制, 并根据模板分子的三维尺寸进行定制, 在合理的模板覆盖率达到良好的模板洗脱效果, 获得尽可能多的印迹空腔, 实现高效印迹; 通用性体现在该技术适用于不同分子量大小和三维尺寸的模板分子(包括小分子单糖、糖链、糖肽以及糖蛋白等)以及良好的基质通用性, 能在二维和三维基质表面进行印迹。因此, 硼亲和可控定向表面分子印迹是一种可控、通用、高效的印迹方法。该方法的提出不仅扩展了分子印迹技术的应用范围, 也在方法学上将分子印迹技术推向了新的高度, 具有重要的科学意义。本文从硼亲和可控定向表面分子印迹技术的制备方法、原理、应用及研究进展等方面进行综述并展望其未来可能的发展方向。

1 从硼亲和糖蛋白可控定向表面印迹到硼亲和单糖可控定向表面印迹

硼亲和可控定向表面分子印迹技术的发展是一个

不断研究探索与前行的过程, 模板分子的相对分子质量和分子尺寸越小, 越难以实现准确可控, 其印迹的难度和挑战性越强。随着印迹对象变得越来越精细, 硼亲和可控定向表面分子印迹技术的发展大致经历了如下3个阶段: 针对糖蛋白印迹的硼亲和可控定向表面印迹技术、针对糖链印迹的硼亲和和糖链定向表面印迹技术以及适合小分子单糖印迹的硼亲和和单糖定向表面印迹技术。

1.1 硼亲和和糖蛋白可控定向表面印迹技术

硼亲和可控定向表面印迹技术最早由Liu课题组^[23]提出, 其目的是为了高效印迹不同分子量大小和三维尺寸的糖蛋白(包括核糖核酸酶B(RNase B)、辣根过氧化物酶(HRP)和转铁蛋白(TRF)), 为糖蛋白的印迹提供有效、通用的印迹策略, 解决蛋白质印迹困难的问题。其印迹原理如图2所示。主要制备过程如下: 首先, 将模板糖蛋白锚定在硼酸功能化的基质上, 再以等摩尔比的多巴胺(DA)和间氨基苯硼酸(APBA)为双印迹单体, 在pH 8.5的弱碱性条件下利用过硫酸铵引发聚合并通过控制聚合时间来获得合适厚度的印迹层, 最后用含有10%十二烷基磺酸钠(SDS)的0.1 mol/L HAc溶液对模板进行洗脱, 形成印迹聚合物。该技术采用水溶性的DA和APBA为双印迹单体, 不仅有效避免了有机溶剂可能产生的蛋白质模板变性, 还由于双印迹单体良好的聚合可控性, 简化了印迹步骤, 印迹过程中通过严格控制印迹条件(如印迹时间)即可精准调节印迹层厚度, 获得高的模板去除率, 实现高效印迹(印迹效率高48.5%)。更有趣的是, 通过该技术制得的印迹聚合

图1 (网络版彩色) 硼亲和可控定向表面分子印迹技术原理图^[20]

Figure 1 (Color online) Schematic of boronate affinity controllable-oriented surface imprinting^[20]

图2 (网络版彩色)硼亲和和糖蛋白可控定向表面印迹技术原理图^[23]

Figure 2 (Color online) Schematic diagram of boronate affinity-based controllable oriented surface imprinting of glycoproteins^[23]

物在不同pH下对模板分子保持良好选择性的同时还可对亲和力进行微调, 这为分子印迹过程中亲和力的决定性因素提供了新的见解, 也为发展新的分子印迹仿生识别材料提供了指导。

受硼亲和和可控定向表面印迹技术的启发, Qu课题组^[30]以具有不同分子尺寸的糖蛋白为模板, 研究了印迹效果与印迹层厚度之间的关系, 并给出了半定量式的结论。他们以间氨基苯硼酸(APBA)功能化的MNPs (MNPs@B(OH)₂)为基底, 分别以RNase B(三维尺寸为3.1 nm×5.1 nm×7.6 nm)、HRP(三维尺寸为4.0 nm×6.7 nm×11.7 nm)和葡萄糖氧化酶(GOx, 三维尺寸为5.8 nm×13.2 nm×15.1 nm)为模板, 将模板分子锚定在MNPs@B(OH)₂材料上后以DA为印迹单体, 在水相中分别聚合不同时间后(1, 3, 6, 9 和15 h), 用体积比为3%的醋酸溶液(含0.1% SDS)洗脱模板以形成印迹空腔, 最后实现了模板糖蛋白的选择性亲和分离。文中分别考察了3种模板糖蛋白的印迹效果与印迹时间的关系, 结果发现RNase B, HRP和GOx的最佳印迹时间分别是1, 3和6 h, 在该印迹时间下印迹材料对相应的模板分子均展示了最大的保留容量、最强的亲和力以及最高的印迹因子。通过考察印迹层的最佳厚度与相应模板分子三维尺寸之间的关系得出了如下结论: 模板分子的结构对印迹聚合物的设计有着决定性作用, 理想的印迹层厚度应与模板分子的三维尺寸有着最好的匹配效应。

1.2 硼亲和和糖链可控定向表面印迹技术

凝集素是一类能够识别特定糖基的蛋白质, 在糖类化合物分析中发挥着十分重要的作用。然而, 由于其生物大分子的特性, 凝集素也有着许多难以避免的问题, 如制备困难、价格昂贵、储存稳定性差以及目标

物的释放需要高浓度糖的竞争等。为了解决这些问题, Bie等人^[31]提出了硼亲和和糖链定向表面印迹技术用于模拟凝集素识别糖蛋白及其特征片段, 其制备原理如图3所示。该技术的主要制备过程如下: 首先以硼酸功能化的MNPs为基底, 在弱碱性条件下通过硼亲和作用将模板糖链(文中分别以TRF和RNase B酶切得到的糖链为模板)锚定在MNPs表面, 然后以原硅酸四乙酯(TEOS)为印迹单体, 在氨水的乙醇溶液中进行水解缩聚反应, 在锚定过模板糖链的MNPs表面形成印迹层, 最后用0.1 mol/L HAc水溶液多次洗脱模板, 形成印迹空腔。该技术中TEOS聚合物层的厚度与缩聚时间在一定范围内呈线性关系, 因此可通过控制印迹时间来方便地调节印迹层的厚度, 实现高效印迹(TRF糖链的印迹效率43.5%, 印迹因子高达21.8)。结果证明, 所得糖链印迹MNPs不仅对模板糖链有着良好的选择性识别能力, 还能识别含有模板糖链的完整蛋白, 完成从人血清复杂样品中对TRF的选择性萃取。与凝集素相比, 糖链印迹MNPs不仅制备简单、价格低廉、稳定性好, 且目标物的释放条件更加温和, 通过弱酸性条件即可洗脱, 质谱兼容性好, 在糖蛋白组学、医疗诊断等领域有着良好的应用前景。

1.3 硼亲和和单糖可控定向表面印迹技术

糖基化表达水平异常是癌细胞共有的特征之一, 某些糖链结构的异常表达现已用作癌细胞识别的标志物, 尤其是唾液酸化糖链, 由于其在癌细胞表面普遍高表达而被广泛用作癌症的生物标志物。因此, 糖基化异常表达行为为癌细胞靶向识别提供了理论可行性。围绕这一切入点, 以特定单糖及其衍生物为模板印迹的荧光纳米材料被相继报道用于癌细胞表面模板单糖

图3 (网络版彩色)硼亲和和糖链可控定向表面印迹磁纳米粒子(MNPs)的制备及其对糖蛋白和特征片段的识别^[31]. (a) 制备糖链模板; (b) 制备糖链硼亲和和可控定向表面印迹的MNPs; (c) 糖链印迹MNPs识别糖蛋白及其特征片段

Figure 3 (Color online) Synthesis route and specific recognition of boronate-affinity controllable glycan-oriented surface imprinted MNPs. (a) Preparation of the glycan templates. (b) Boronate-affinity glycan-oriented surface imprinting for producing glycan-imprinted MNPs. (c) Recognition of a glycoprotein and its characteristic fragments by glycan-imprinted MNPs

的选择性标记^[32]以及癌细胞靶向识别与成像^[12,33]. Liu课题组^[26-29]以硼亲和和定向表面印迹策略为核心发展了硼亲和和单糖定向表面印迹技术,在这方面做了系统的研究工作.该印迹技术的制备原理如图4所示,其主要策略是以表面硼酸功能化的不同纳米材料(如银纳米粒子、金纳米棒、SiO₂纳米粒子、量子点等)为基底,通过硼亲和作用将模板单糖锚定在材料表面,然后通过合适的印迹单体(如TEOS)聚合后形成印迹层,最后在弱酸性条件破坏硼亲和作用来对模板分子进行洗脱,形成印迹空腔.

首先,他们以硼酸功能化的银纳米粒子(AgNPs)为基底,通过硼亲和作用将唾液酸(SA)模板分子锚定在AgNPs表面;然后利用TEOS印迹单体在氨水的乙醇溶液中水解缩聚形成印迹层,并根据印迹时间调节印迹层厚度;最后在0.1 mol/L HAc条件下移除模板,形成

SA印迹的AgNPs.通过与表面增强拉曼散射(SERS)检测技术结合,实现了癌细胞和组织的靶向识别与SERS成像^[26].为了证实单糖印迹策略在癌细胞靶向识别方面的通用性,该课题组又以硼酸功能化的SiO₂荧光纳米粒子为基底,分别以SA、岩藻糖(Fuc)和甘露糖(Man)为模板,TEOS为印迹单体,利用硼亲和和单糖定向表面印迹技术制备了不同单糖印迹的SiO₂荧光纳米粒子用于癌细胞靶向识别与荧光成像^[27].通过定制印迹层厚度,SA, Fuc和Man模板覆盖率分别为81%, 88%和85%,结果证明3种模板分子均获得了良好的印迹效果,包括高的印迹因子、较强的亲和力和优良的识别选择性等.

值得注意的是,小分子单糖的分子量与分子尺寸较小,制备印迹效率高、识别特异性好的MIPs更加困难.因此,硼亲和和单糖定向表面印迹技术不仅是硼亲和和可控定向表面分子印迹技术的补充与完善,更重要的

图4 (网络版彩色) 硼亲和和单糖可控定向表面印迹纳米粒子的制备及其对模板单糖的特异性识别^[27]. (a) FITC掺杂SiO₂纳米粒子的合成; (b) 单糖印迹FITC掺杂的SiO₂纳米粒子的制备; (c) 单糖印迹纳米粒子与细胞表面模板单糖的结合机制

Figure 4 (Color online) Schematic of the synthesis route of FITC-doped silica NPs (a), monosaccharide-imprinted FITC doped silica NPs (b) and the scheme to illustrate the interaction between monosaccharide-imprinted NPs and cells (c), illustrated with SA as an example^[27]

是该技术首次实现了结构和尺寸仅有微小差异的不同小分子(如Fuc和Man)的高效印迹并完成选择性识别. 这在分子印迹方法学上无疑是巨大的进步, 为仿生分子识别材料的设计和制备提供了指导.

2 硼亲和和可控定向表面分子印迹技术的应用

硼亲和和可控定向表面分子印迹技术的适用模板从最初的大分子糖蛋白到糖链再到小分子单糖, 随着模板分子的结构与尺寸越来越精细, 该印迹技术也从发

展之初的糖蛋白印迹进一步完善成了一种精准可控的糖类化合物通用型印迹策略. 由于其良好的可控性以及模板与基质的通用性, 硼亲和和可控定向表面印迹技术从发展之初便受到了研究者的强烈关注, 其应用主要包括以下几方面.

2.1 亲和分离

硼亲和和可控定向表面印迹技术发展之初便主要是用于糖蛋白的亲和分离^[23,31], 包括糖蛋白印迹整体材

料和磁性纳米材料等。此外,还有许多其他基质形式的印迹材料也通过该印迹方式被制备出来用于亲和分离。师彦平课题组^[34]以Au包裹的 Fe_3O_4 磁性纳米粒子(MNPs)为基底,在其表面通过Au-S键修饰上巯基苯硼酸,然后在弱碱性条件下利用硼亲和作用将模板糖蛋白HRP锚定在硼酸功能化的MNPs表面,再利用过硫酸铵引发苯胺和N-苯基乙醇胺双印迹单体在水相中自聚形成印迹层,最终用5% HAc溶液(含30%乙腈)洗脱模板形成印迹空腔。他们通过优化两个印迹单体的组成比例、引发剂的含量以及聚合时间来获得理想的印迹层厚度,达到最佳的印迹效率。所得MIPs有着良好的识别选择性、高的保留容量和印迹因子,实现了在混合样品中对模板糖蛋白的选择性萃取。2018年,师彦平课题组^[35]又发展出了一种多识别位点的糖蛋白印迹材料用于同时选择性萃取两种糖蛋白。他们以硼酸功能化的MNPs为基底,将两种模板糖蛋白(HRP和卵清蛋白(OVA))先固定在MNPs表面,然后通过多巴胺在水相中的自聚合反应在材料表面形成印迹层,最后在含有一定有机溶剂的弱酸性条件下洗脱模板形成印迹空腔。由于多巴胺良好的亲水性和聚合可控性,因此该方法可通过控制聚合时间方便地调节印迹层厚度。然而,值得一提的是,由于该方法采用了两种模板蛋白,且分子量大小和三维尺寸均不同,因此要获得理想的印迹效果,两模板分子的配比和印迹层厚度(印迹时间)须两者

兼顾。最后在优化的条件下,两种模板分子都有着较好印迹效果,包括较高的结合容量、印迹因子和良好的识别选择性等,并通过凝胶电泳证明了所得MIPs成功地用于胎牛血清中HRP和OVA的选择性亲和分离。

2.2 酶活性分析

酶活性测试在医疗诊断等领域意义重大,然而常规的酶活性试验常存在严重的基质干扰,为了解决这个问题,Bi和Liu^[24]以糖蛋白碱性磷酸酶(ALP)为模板、苯胺和2-苯基乙醇胺为聚合单体,通过硼亲和可控定向表面印迹法制备了ALP印迹的96孔酶标板并用于人血清中ALP的酶活性分析,其制备过程如图5所示。通过优化印迹条件(包括印迹时间、聚合单体的比例和浓度等),所得MIPs对模板分子展示了高的亲和力(K_d 为 10^{-10} mol/L水平)和极好的抗干扰能力(即使存在浓度比模板分子高90000倍的干扰蛋白,MIPs仍能维持至少41%的初始模板分子结合容量),证明了ALP印迹的MIPs用于实际样品中酶活性测试的可行性。此外,由于硼亲和MIPs在萃取酶之后能很好地维持其活性,因此ALP印迹的MIPs能在萃取实际样品中的酶后直接用于酶活性测试,因而大大缩短了分析时间,且避免了其他方法中因酶释放等步骤可能造成的酶活性损失。这些独特的优势使得MIPs在酶活性分析方面展示了良好的应用前景。

图5 (网络版彩色)糖蛋白印迹96孔酶标板的制备过程^[24]

Figure 5 (Color online) Preparation procedure of the glycoprotein-imprinted 96-well microplate^[24]

2.3 药物检测

Wang等人^[36]以黄酮类药物—芦丁为模板分子, 先将芦丁分子与APBA通过硼亲和作用结合, 再将多壁碳纳米管修饰过的玻碳电极插入结合过模板分子的APBA溶液中, 通过可控电聚合的方式使APBA自聚并在电极表面形成包裹模板分子在内的印迹层, 然后用0.5 mol/L硫酸溶液去除模板以形成印迹空腔. 文中通过优化APBA电聚合的循环次数来优化印迹层厚度, 达到最佳效果. 结果证明在电聚合循环15次时印迹效果最好, 该条件下制得的MIPs具有较高的印迹因子(MIPs和NIPs净电流信号之比)、良好的识别选择性和较宽泛线性响应能力(0.4~10 $\mu\text{mol/L}$). 最后用该条件下制得的分子印迹玻碳电极对两种市售的芦丁片剂进行了含量检测, 所得结果与标称含量基本一致, 证明了该分子印迹电极在实际药物样品检测中的可行性.

2.4 疾病诊断

Bi和Liu^[25]以糖蛋白 α -甲胎蛋白(AFP)为模板、苯胺为聚合单体, 利用硼亲和可控定向表面印迹策略制备了AFP印迹的96孔酶标板用于酶联免疫分析. 通过调节印迹层厚度, AFP印迹的96孔酶标板对模板分子展示了强的亲和作用(K_d 为nmol/L水平)和良好的选择性, 使糖蛋白印迹的酶标板取代传统抗体修饰的酶标板用于复杂样品中痕量糖蛋白的酶联免疫分析成为可能. 此外, 常规的酶联免疫试验常常存在一些难以避免的问题, 如价格昂贵、储存稳定性差、操作条件苛刻

等, 且难以做到复杂样品中痕量分析物的高特异性、超灵敏检测. 为了解决这些问题, Tu等人^[37]和Muhammad等人^[38]将硼亲和可控定向表面印迹技术良好的识别特异性与等离子体免疫夹心试验超高的检测灵敏度相结合, 分别制备了EPO和AFP/ALP印迹的等离子体增强拉曼探针, 实现了血清样品中糖蛋白促红细胞生成素(EPO)和糖蛋白疾病标志物AFP, ALP的快速(整个过程30 min内完成)、超灵敏检测(EPO和AFP的检测限达 10^{-14} mol/L水平, ALP的检测限也达到了 10^{-12} mol/L水平), 为国际反兴奋剂检测以及痕量样品的生化分析提供了强有力的技术支持.

2.5 单细胞分析

单细胞分析技术对于探索和理解细胞功能与微异质性行为不可或缺. Liu课题组^[39]分别以糖蛋白碱性磷酸酶(ALP)为模板、等摩尔比的水溶性多巴胺和间氨基苯硼酸为双印迹单体, 通过硼亲和可控定向表面印迹技术制备萃取微探针用于单个活细胞中低拷贝数蛋白的等离子体免疫夹心试验(PISA), 这是分子印迹技术首次成功地应用于单个活细胞中的疾病标志物分析, 其制备原理如图6(b)所示. 该技术巧妙地将亲和萃取和等离子体增强拉曼散射(PERS)结合起来, 利用分子印迹微探针特异性萃取细胞中的目标蛋白后用拉曼活性的纳米标签进行标记, 在PERS检测模式下拉曼信号强度增强倍数达9个数量级, 成功地实现了对模板分子的高特异性、高灵敏检测(对ALP的检测限达到了 $6.0 \times$

图6 (网络版彩色)微萃取探针的制备原理^[39]. (a) 制备金层包覆的微探针; (b) 制备基于MIP的微探针; (c) 制备抗体固定的微探针
Figure 6 (Color online) Schematic of the procedures for the preparation of extraction microprobes^[39]. (a) The preparation of Au-coated microprobes. (b) The preparation of MIP-based microprobes. (c) Antibody-immobilized microprobes

10^{-11} mol/L), 考虑到测试样品的实际体积只有10 pL, 因此该PISA方法对ALP的绝对检测能力达到了几百个分子水平, 这无疑将分子印迹技术在细胞方面的应用推向了一个新的高度, 也为单个活细胞分析提供了新的技术手段。

2.6 细胞成像与癌症靶向治疗

硼亲和单糖可控定向表面印迹技术最初的发展目的便是为了癌细胞的靶向识别与成像。虽然单糖印迹的纳米材料已被成功地证明可用于癌细胞靶向识别与成像^[26,27], 然而对于表达相同单糖的不同细胞的特异性识别却无能为力。Liu课题组^[28]以具有相同激发波长、不同发射波长的硼酸功能化的荧光量子点为基底, 分别以SA, Fuc和Man为模板分子, TEOS为印迹单体, 同样通过硼亲和和单糖定向表面印迹技术制备了不同单糖(SA, Fuc和Man)印迹的荧光量子点用于细胞多色成像与模式识别, 其原理如图7所示。相比单一模板识别策略而言, 基于多色成像的模式识别是一种依据多模板同时结合的多元靶向识别机制, 这无疑能提高目标细胞靶向识别的准确度。更重要的是, 多色成像和模式识别反映了目标细胞表面不同模板单糖的表达情况并不同层面揭示了单糖相对表达水平与癌细胞类型之间的关系, 不仅实现了癌细胞与正常细胞之间的相互区分, 还实现了不同组织来源癌细胞的相互区分, 为基于糖基化的癌症靶向诊断提供了参考。

等离子体纳米材料(如纳米棒、纳米离子、纳米笼等)已被广泛用于癌症的近红外靶向光热治疗, 这类材料的靶向性能主要依赖于抗体、适配体等具有靶向识别能力的生物分子, 然而这些生物分子存在制备困难、价格昂贵、稳定性差等一些难以避免的问题。Yin等人^[29]利用硼酸功能化的金纳米棒为基底、SA为模

板单糖、TEOS为印迹单体, 通过硼亲和和单糖定向表面印迹技术制备了SA印迹的金纳米棒。由于癌细胞表面高表达SA, 因此制得的印迹金纳米棒被证明能特异性识别癌细胞与活体中的癌组织, 通过结合金纳米棒独特的近红外光热效应, 成功地实现了活体中癌组织的靶向诊疗。

2.7 化学传感

Huang等人^[40]以氧化石墨烯(GO)为基底, 通过硼亲和和可控定向表面印迹技术制备了糖蛋白印迹的GO并结合到玻碳电极上制成仿生电化学传感器用于模板糖蛋白的选择性、高灵敏检测。本文首先利用GO与APBA间的酰胺反应在GO表面修饰硼酸基团($\text{GO@B}(\text{OH})_2$), 再将模板糖蛋白OVA锚定在 $\text{GO@B}(\text{OH})_2$ 表面, 接着以四甲氧基硅烷(TMOS)和苯基三乙氧基硅烷(PTEOS)在水相中的水解和缩聚反应在GO表面聚合形成包裹模板分子在内的印迹层, 然后使用弱酸性条件洗脱模板形成印迹空腔, 利用模板分子洗脱和重连状态下电信号的变化实现对模板糖蛋白的高灵敏度电化学检测(LOD达 2.0×10^{-11} mg/mL, 且线性范围宽达6个数量级)。最后将所得OVA印迹的电化学传感器用于鸡蛋和鹌鹑蛋中OVA含量的测定, 并与目前较为成熟的测定方法——ELISA法进行比较, 两种方法所得结果基本一致, 证明了分子印迹电化学传感器在实际复杂样品分析中的可行性与可靠性。

2.8 植物组织中糖类化合物的快速检测

Muhammad等人^[41]以Au涂覆的针灸针为基底, 在硼酸功能化后利用硼亲和和可控定向表面印迹技术制得了葡萄糖和果糖印迹的针灸针。当印迹针灸针结合模板分子后再以硼酸功能化的Ag纳米粒子为拉曼信号探

图7 (网络版彩色)单糖印迹量子点用于细胞多色成像与模式识别原理图^[28]

Figure 7 (Color online) Schematic of pattern recognition of cells via multiplexed imaging with monosaccharide-imprinted QDs^[28]

针对模板分子进行标记, 这样便形成等离子亲和和夹心结构. 在激光束照射下, 该夹心结构可产生表面等离子现象而增强Ag纳米粒子本身的拉曼信号, 形成等离子增强拉曼散射, 可进行超灵敏检测. 最后他们以苹果为植物组织样本, 完成了样本中葡萄糖和果糖的高特异性(竞争单糖浓度为模板单糖10倍的情况下, 交叉反应性仍低于9%)、高灵敏度(检测限为1 $\mu\text{g/mL}$)和快速(全过程仅需20 min)检测, 并且证明了模板单糖在苹果样本中含量与其空间分布有关.

3 硼亲和和精准可控分子印迹技术

糖基化翻译后修饰在许多生物过程中起着重要作用, 如蛋白质折叠与定位、细胞黏附、信号转导等, 同时糖基化异常表达也与多种疾病有关, 因此糖链是极具价值的疾病诊疗靶标. 糖链抗体是目前利用糖链作为靶标进行疾病诊疗的重要手段, 然而归因于低免疫原性和制备困难、价格昂贵等因素, 糖链抗体数量稀缺, 根本无法满足需要. 为了解决这个问题, Bie等人^[42]在硼亲和和可控定向表面印迹策略基础上发展出了硼亲和和精准可控分子印迹技术并通过该技术制备了O-糖链和N-糖链印迹的磁性纳米粒子(MNPs), 实现了含有模板糖链的糖肽和糖蛋白的选择性萃取. 其制备原理如图8所示, 主要包括以下几步: (1) 目标糖蛋白通过硼亲和和作用锚定到硼酸功能化纳米材料表面; (2) trypsin酶原位酶解(得到较长的糖肽); (3) Pronase E酶原位酶解(得到较短的糖肽); (4) 以TEOS为印迹单体进行精准印迹; (5) 弱酸性条件下进行模板移除. 归因于印迹层厚度与聚合时间之间良好的线性关系, 通过精准控制印迹时间便可制得不同长度糖肽印迹的纳米材料. 最终

在印迹时间为35 min时取得了最佳的印迹效果, 该条件下能较好地兼顾不同长度糖肽的印迹, 对于较短糖肽、中等长度糖肽以及较长糖肽的模板覆盖率分别为84.9%~86.8%, 64.5%~68.2%和42.3%, 所得印迹材料对目标糖蛋白和模板糖肽均具有良好的识别选择性. 由于从糖蛋白中酶切O-糖链的酶极少, 且糖链的化学合成十分困难, 因此糖链印迹MNPs对糖链的选择性识别有着十分重要的生物学意义, 也为糖链特异性人工抗体的合成提供了参考.

4 展望

硼亲和和可控定向表面分子印迹技术的提出将分子印迹技术推向了新的高度, 对分子印迹领域提出了新的技术要求, 使分子印迹技术更好地满足了不同领域的分析需要. 尽管如此, 该技术仍有一定的局限性, 未来可能的发展方向主要集中在如下几方面: (1) 现有硼亲和和可控定向表面分子印迹技术仅限于以硼亲和作用为基础的印迹方式, 模板分子也仅限于糖类化合物, 探索其他模板固定方式甚至无模板固定的可控印迹方法才能对更多模板分子进行印迹, 更充分地体现该技术的通用性与实用性; (2) 目前适用于硼亲和和可控定向表面分子印迹的印迹体系较少, 生物兼容性好且操作条件温和的水相印迹体系更少, 一定程度上限制了该技术的发展与应用, 开发更多精准可控且生物兼容性好的印迹体系同样是该技术的重要发展方向; (3) 相比本体印迹等传统印迹方式而言, 虽然硼亲和和可控定向表面印迹技术的识别特异性明显提高, 但仍无法满足某些高要求的实际应用(如临床诊断), 针对这方面的深入研究将具有重要的实用价值.

图8 (网络版彩色)结合双重酶解与硼亲和和可控定向表面印迹的硼亲和和精准印迹技术原理图^[42]

Figure 8 (Color online) Schematic of the precision imprinting strategy through combining *in situ* dual enzymatic digestion and the boronate affinity controllable oriented surface imprinting (BACOSI) approach^[42]

参考文献

- 1 Shi H, Tsai W B, Garrison M D, et al. Template-imprinted nanostructured surfaces for protein recognition. *Nature*, 1999, 398: 593–597
- 2 Chen L, Xu S, Li J. Recent advances in molecular imprinting technology: Current status, challenges and highlighted applications. *Chem Soc Rev*, 2011, 40: 2922–2942
- 3 Hoshino Y, Kodama T, Okahata Y, et al. Peptide imprinted polymer nanoparticles: A plastic antibody. *J Am Chem Soc*, 2008, 130: 15242–15243
- 4 Wang H J, Zhou W H, Yin X F, et al. Template synthesized molecularly imprinted polymer nanotube membranes for chemical separations. *J Am Chem Soc*, 2006, 128: 15954–15955
- 5 Pan X, He X, Liu Z. Molecularly imprinted mesoporous silica nanoparticles for specific extraction and efficient identification of Amadori compounds. *Anal Chim Acta*, 2018, 1019: 65–73
- 6 Haupt K, Mosbach K. Molecularly imprinted polymers and their use in biomimetic sensors. *Chem Rev*, 2000, 100: 2495–2504
- 7 Li J, Li Y, Zhang Y, et al. Highly sensitive molecularly imprinted electrochemical sensor based on the double amplification by an inorganic prussian blue catalytic polymer and the enzymatic effect of glucose oxidase. *Anal Chem*, 2012, 84: 1888–1893
- 8 Wulff G. Enzyme-like catalysis by molecularly imprinted polymers. *Chem Rev*, 2002, 102: 1–27
- 9 Ye J, Chen Y, Liu Z. A boronate affinity sandwich assay: An appealing alternative to immunoassays for the determination of glycoproteins. *Angew Chem Int Ed*, 2014, 53: 10386–10389
- 10 Kurczewska J, Ceglowski M, Pecyna P, et al. Molecularly imprinted polymer as drug delivery carrier in alginate dressing. *Mater Lett*, 2017, 201: 46–49
- 11 Zaidi S A. Molecular imprinted polymers as drug delivery vehicles. *Drug Deliv*, 2014, 23: 2262–2271
- 12 Panagiotopoulou M, Salinas Y, Beyazit S, et al. Molecularly imprinted polymer coated quantum dots for multiplexed cell targeting and imaging. *Angew Chem Int Ed*, 2016, 55: 8244–8248
- 13 Hoshino Y, Koide H, Urakami T, et al. Recognition, neutralization, and clearance of target peptides in the bloodstream of living mice by molecularly imprinted polymer nanoparticles: A plastic antibody. *J Am Chem Soc*, 2010, 132: 6644–6645
- 14 Cecchini A, Raffa V, Canfarotta F, et al. *In vivo* recognition of human vascular endothelial growth factor by molecularly imprinted polymers. *Nano Lett*, 2017, 17: 2307–2312
- 15 Hashemi-Moghaddam H, Rahimian M, Niromand B. Molecularly imprinted polymers for solid-phase extraction of sarcosine as prostate cancer biomarker from human urine. *Bull Korean Chem Soc*, 2013, 34: 2330–2334
- 16 Gao D, Zhang Z, Wu M, et al. A surface functional monomer-directing strategy for highly dense imprinting of TNT at surface of silica nanoparticles. *J Am Chem Soc*, 2007, 129: 7859–7866
- 17 Lu C H, Zhang Y, Tang S F, et al. Sensing HIV related protein using epitope imprinted hydrophilic polymer coated quartz crystal microbalance. *Biosens Bioelectron*, 2012, 31: 439–444
- 18 Shen X, Ye L. Molecular imprinting in Pickering emulsions: A new insight into molecular recognition in water. *Chem Commun*, 2011, 47: 10359–10361
- 19 Shen X, Zhou T, Ye L. Molecular imprinting of protein in Pickering emulsion. *Chem Commun*, 2012, 48: 8198–8200
- 20 Xing R, Wang S, Bie Z, 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
- 21 Li D, Chen Y, Liu Z. Boronate affinity materials for separation and molecular recognition: Structure, properties and applications. *Chem Soc Rev*, 2015, 44: 8097–8123
- 22 Liu Z, He H. Synthesis and applications of boronate affinity materials: From class selectivity to biomimetic specificity. *Acc Chem Res*, 2017, 50: 2185–2193
- 23 Wang S, Ye J, Bie Z, et al. Affinity-tunable specific recognition of glycoproteins via boronate affinity-based controllable oriented surface imprinting. *Chem Sci*, 2014, 5: 1135–1140
- 24 Bi X, Liu Z. Enzyme activity assay of glycoprotein enzymes based on a boronate affinity molecularly imprinted 96-well microplate. *Anal Chem*, 2014, 86: 12382–12389
- 25 Bi X, 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
- 26 Yin D, Wang S, He Y, et al. Surface-enhanced Raman scattering imaging of cancer cells and tissues via sialic acid-imprinted nanotags. *Chem Commun*, 2015, 51: 17696–17699
- 27 Wang S, Yin D, Wang W, et al. Targeting and imaging of cancer cells via monosaccharide-imprinted fluorescent nanoparticles. *Sci Rep*, 2016, 6: 22757

- 28 Wang S, Wen Y, Wang Y, et al. Pattern recognition of cells via multiplexed imaging with monosaccharide-imprinted quantum dots. *Anal Chem*, 2017, 89: 5646–5652
- 29 Yin D, Li X, Ma Y, et al. Targeted cancer imaging and photothermal therapy via monosaccharide-imprinted gold nanorods. *Chem Commun*, 2017, 53: 6716–6719
- 30 Wu G, Li J, Qu X, et al. Template size matched film thickness for effectively *in situ* surface imprinting: A model study of glycoprotein imprints. *RSC Adv*, 2015, 5: 47010–47021
- 31 Bie Z, Chen Y, Ye J, et al. Boronate-affinity glycan-oriented surface imprinting: A new strategy to mimic lectins for the recognition of an intact glycoprotein and its characteristic fragments. *Angew Chem Int Ed*, 2015, 54: 10211–10215
- 32 Shinde S, El-Schich Z, Malakpour A, et al. Sialic acid-imprinted fluorescent core-shell particles for selective labeling of cell surface glycans. *J Am Chem Soc*, 2015, 137: 13908–13912
- 33 Kunath S, Panagiotopoulou M, Maximilien J, et al. Cell and tissue imaging with molecularly imprinted polymers as plastic antibody mimics. *Adv Healthcare Mater*, 2015, 4: 1322–1326
- 34 Ma R T, Ha W, Chen J, et al. Highly dispersed magnetic molecularly imprinted nanoparticles with well-defined thin film for the selective extraction of glycoprotein. *J Mater Chem B*, 2016, 4: 2620–2627
- 35 Sun X Y, Ma R T, Chen J, et al. Synthesis of magnetic molecularly imprinted nanoparticles with multiple recognition sites for the simultaneous and selective capture of two glycoproteins. *J Mater Chem B*, 2018, 6: 688–696
- 36 Wang C, Wang Q, Zhong M, et al. Boronic acid based imprinted electrochemical sensor for rutin recognition and detection. *Analyst*, 2016, 141: 5792–5798
- 37 Tu X, 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
- 38 Muhammad P, Tu X, Liu J, et al. Molecularly imprinted plasmonic substrates for specific and ultrasensitive immunoassay of trace glycoproteins in biological samples. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2017, 9: 12082–12091
- 39 Liu J, Yin D, Wang S, et al. Probing low-copy-number proteins in a single living cell. *Angew Chem Int Ed*, 2016, 55: 13215–13218
- 40 Huang J, Wu Y, Cong J, et al. Selective and sensitive glycoprotein detection via a biomimetic electrochemical sensor based on surface molecular imprinting and boronate-modified reduced graphene oxide. *Sens Actuators B-Chem*, 2018, 259: 1–9
- 41 Muhammad P, Liu J, Xing R, et al. Fast probing of glucose and fructose in plant tissues via plasmonic affinity sandwich assay with molecularly-imprinted extraction microprobes. *Anal Chim Acta*, 2017, 995: 34–42
- 42 Bie Z, Xing R, He X, et al. Precision imprinting of glycopeptides for facile preparation of glycan-specific artificial antibodies. *Anal Chem*, 2018, 90: 9845–9852

Summary for “硼亲和可控定向表面分子印迹技术研究进展”

Advance in boronate affinity-based controllable oriented surface imprinting

Shuangshou Wang^{1*}, Xiaomei Lu², Jie Cheng¹ & Qiongqiong Ge¹

¹ School of Chemistry and Chemical Engineering, Anhui University of Technology, Ma'anshan 243032, China;

² Department of Cardiology, Nanjing BenQ Medical Center, the Affiliated BenQ Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210019, China

* Corresponding author, E-mail: wangss17@ahut.edu.cn

Biomolecules, like antibody, aptamer and lectin, are still the main force for applications involved in selective separation and recognition. However, these biomolecules are usually suffered from many inevitable problems, such as hard to prepare, high cost, poor stability, as well as limited quantities. Molecular imprinting technique (MIT) as a robust biomimetic molecular recognition strategy to mimic the targeting ability of antibody and enzyme plays a significant role in many areas, including chemical separation, biosensing, catalysis, disease diagnosis, etc. Scientists have pay a lot of attention to developing advanced imprinting approaches to enable MIT adapt many more possible applications. Several user-friendly molecular imprinting methods, such as surface imprinting, epitope imprinting and emulsion imprinting, are hence developed to meet the high analytical requirements. Even so, facile MITs with wide-range versatility and high imprinting efficiency are extremely limited, which restrict the applicability of MIT.

Boronate affinity-based controllable oriented surface imprinting (BACOSI) allows for easy and efficient preparation of molecularly imprinted polymers specific to saccharide compounds, which covering glycoproteins, glycopeptides, glycans and monosaccharides. In this paper, the principle, preparation process, applications and recent developments of BACOSI are briefly introduced. Three steps, namely template immobilization, oriented imprinting and template removal, are included in this approach. Template molecules (glycoprotein, glycopeptide, glycan or monosaccharide) immobilized on the surface of boronic-acid-functionalized substrate by virtue of boronate affinity interaction, followed by controllable self-polymerization of biocompatible monomer(s) to form an imprinting layer on the template-anchored substrate with tailored thickness in terms of molecule size of templates, and then the templates are effectively removed under suitable conditions (weak acidic solutions with or without surfactant are often utilized for templates removal). Imprinting in this approach is performed in a precise-controllable manner permitting the thickness of the imprinting layer to be fine-tuned via adjusting the imprinting time. This manner not only simplifies the imprinting procedure but also makes the approach widely applicable to a large range of sugar-containing biomolecules. Most of all, it can provide a guidance for design and preparation of other biomimetic molecular recognition materials, and a new level in methodology of MIT has been promoted by the presentation of this approach.

In addition, some issues and future prospects of BACOSI are also presented in this paper based on our previous researches. From the viewpoint of preparation mechanism, template anchoring of BACOSI highly relies on the boronate affinity effect between boronic acid and *cis-diol* groups, thus it does not work for non-*cis-diol*-containing compounds. Exploiting some other means for template immobilization or template-anchoring-free imprinting modes is benefit for extending the application scope of BACOSI. Likewise, ideal biocompatibility and the ability of targeting are also significant for biological applications, for instance, cell imaging, clinical diagnosis and therapy. (Nevertheless, available aqueous phase polymerization for BACOSI is very limited, and its non-specific effect is also cannot be ignored when used for clinical analysis. The further study and exploration of imprinting system with negligible non-specific effect and suitable for the biomedical analysis is the key to form practical imprinting technology). In summary, BACOSI strategy just opens the pathway for the research and application based on facile and versatile imprinting technique in the future, there is still a long distance from being ready for use on industrial production and commercialization.

boronate affinity, molecular imprinting, biomimetic molecular recognition, cell imaging, glycoprotein, cancer

doi: [10.1360/N972018-01009](https://doi.org/10.1360/N972018-01009)