完整糖蛋白为准模板的有机相中聚糖的硼亲和可控定向表面印迹

郭展辰, 邢荣荣, 贺晖, 刘震*

南京大学化学化工学院, 生命分析化学国家重点实验室, 南京 210023

* 联系人, E-mail: zhenliu@nju.edu.cn

2018-10-10 收稿, 2018-11-12 修回, 2018-11-14 接受, 2018-12-24 网络版发表

国家杰出青年科学基金(21425520)资助

摘要 糖蛋白具有十分重要的生理功能和临床价值, 对于糖蛋白的特异性识别具有重要的科学意义和应用价值. 分子印迹技术是制备具有特异性分子识别的功能聚合物的重要方法, 已经用于糖蛋白的识别. 但是, 在有机相中以蛋白质为模板的印迹方法容易导致模板蛋白质的变性, 不易获得良好的分子识别性能, 而以糖链为模板的印迹方法需要比较复杂的糖链制备过程. 本文提出了直接以完整糖蛋白为准模板, 在乙醇相中可控地印迹其糖链, 用于制备能识别糖蛋白的分子印迹聚合物的方法. 本文以碱性磷酸酶为目标蛋白, 以硼亲和磁性纳米颗粒作为基础材料, 通过硼亲和作用固定目标糖蛋白, 利用原硅酸四乙酯-无水乙醇印迹体系, 根据糖蛋白糖链的结构, 无须优化, 直接控制印迹时间, 仅印迹糖链部分, 得到磁性分子印迹纳米颗粒. 所得磁性分子印迹纳米颗粒对目标糖蛋白具有良好的特异性识别能力, 即使在复杂的实际样品中, 也可以保持这种特性. 本方法直接使用完整糖蛋白作为模板, 无须通过酶切等烦琐步骤获得模板, 方法效率高. 本文方法在一定程度上克服了传统印迹方法中无法在有机相中印迹完整蛋白的局限, 拓展了分子印迹技术的应用范围, 在亲和分离与疾病诊断等重要领域中具有重要的应用潜力.

关键词 分子印迹, 可控印迹, 硼亲和, 磁性纳米颗粒, 糖蛋白

糖蛋白是蛋白质家族中很重要的一大类, 具有十分重要的生物功能, 包括分子识别, 信号转导, 细胞黏附和免疫应答等^[1-6]. 许多糖蛋白可用作疾病诊断和靶向治疗的重要生物标志物^[7,8]. 然而, 很多具有重要生理意义和临床价值的糖蛋白在体内含量极低, 而与其共存的其他物质通常具有更高的丰度, 导致很多生物样品中的糖蛋白的检测仍旧是具有挑战性的任务. 因此, 对于糖蛋白的特异性识别和富集具有重要意义. 尽管抗体已广泛用于特异性识别糖蛋白^[9], 但其仍具有一些明显的缺点^[10,11], 包括难以制备、稳定性差、成本高和释放条件苛刻等. 所以, 能

克服抗体的这些缺点的替代方案具有重要的价值和意义.

分子印迹聚合物(molecularly imprinted polymers, MIPs)^[12-17]是指在模板分子的存在下通过聚合反应得到的高分子聚合物, 在移除模板后, 聚合物上留下与模板分子三维形状及作用位点相互补的分子印迹空腔, 从而能与模板分子重新结合, 而其他分子不结合. 分子印迹聚合物具有专一性好、预见性高、实用性强等优点, 目前已经成功应用于分离^[18,19]、传感^[20,21]、成像分析^[22-24]、单细胞分析^[25]和靶向治疗^[26,27]等领域. 近年来, 研究人员已经发展出一系列

引用格式: 郭展辰, 邢荣荣, 贺晖, 等. 完整糖蛋白为准模板的有机相中聚糖的硼亲和可控定向表面印迹. 科学通报, 2019, 64: 1418-1426

Guo Z C, Xing R R, He H, et al. Boronate affinity controllable oriented surface imprinting of glycans in organic phase using intact glycoproteins as semi-templates (in Chinese). Chin Sci Bull, 2019, 64: 1418-1426, doi: 10.1360/N972018-01006

新颖的印迹方法,如聚合物纳米颗粒法^[28]、金属整合法^[29]和表面接枝法^[30]等,用于制备能特异性识别糖蛋白的分子印迹聚合物。然而,这些方法都有一些共同的缺点,如通用性差、耗时较长等。

硼酸可以共价结合含有顺式二羟基的化合物,如糖蛋白和糖肽等。在较高的pH条件下,硼酸可以和顺式二羟基分子中的邻二羟基发生共价反应,生成五元或六元的环状酯;当环境pH为酸性时,环状酯解离,释放出顺式二羟基分子^[31]。由于顺式二羟基结构普遍存在于糖蛋白上的糖链中,所以可以利用硼亲和技术达到高效快速富集糖蛋白的目的。近年来,本课题组基于多年来在硼亲和领域的研究积累^[32,33],发展了一系列硼亲和分子印迹聚合物材料^[34-38],用于专一性的识别糖蛋白。特别是,基于硅烷化水解的硼亲和可控定向表面印迹方法^[37,38],适用性强,所得分子识别性能优异,印迹过程简单可控,甚至可以对糖肽模板上的糖链实现精准印迹,得到只识别糖链的分子印迹材料^[39]。但是,该印迹方法所需的印迹模板需要通过酶切等较烦琐步骤制备。若能直接以完整糖蛋白为印迹模板,而印迹时仅印迹糖链部分,则可以显著提高该方法的整体印迹效率。然而,精准可控印迹的理想条件是在醇相中进行硅烷化水解,因为硅烷化试剂在水相中水解速度非常快且无法控制。蛋白质大部分都是水溶性的,其在有机相中容易发生变性。因此,传统的印迹方法中,通常需要在有机相中印迹完整蛋白,这对蛋白质的分子印迹产生了一定的限制。但是基于我们此前的实验技术,可以依据糖蛋白特征糖链的长度,选择合适的印迹时间,直接得到所需的印迹层厚度,仅印迹糖蛋白上的特征糖链,这样就可以得到相应的分子印迹聚合物,不必担心蛋白质部分的结构变化,从而克服有机相中无法印迹完整蛋白的局限。

本文以碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)为目标蛋白,以硼亲和磁性纳米颗粒(boronate affinity MNPs, BA-MNPs)为基底材料,验证了以上设想的可能性。碱性磷酸酶是一种重要的糖蛋白酶,已被用作临床诊断中多种疾病的标志物^[40]。印迹步骤如图1所示,先将目标糖蛋白直接作为印迹模板通过硼亲和作用固定到硼亲和磁性纳米颗粒上,然后加入到原硅酸四乙酯(TEOS)-无水乙醇印迹体系中,进行可控定向表面印迹,控制印迹时间,仅对糖链部分进行印迹,除去模板后即得到印迹了糖链的分子印迹磁性纳米颗粒(molecularly imprinted magnetic nanoparticles, MI-MNPs),该材料能专一结合目标糖蛋白。该方法直接使用完整糖蛋白作为模板,省去了以前方法中较复杂的糖肽模板制备步骤,从而显著提高了方法的效率。

1 材料与方法

(i) 材料与仪器。碱性磷酸酶(ALP)、卵清白蛋白(ovalbumin, OVA)、牛血清蛋白(bovine serum albumin, BSA)、 β -酪蛋白(β -casein)、辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)、腺苷、脱氧腺苷、 α -氨基-4-羟基肉桂酸(CHCA)、芥子酸(SA)和原硅酸四乙酯(TEOS)购于西格玛公司。2,4-二氟-3-氰基苯硼酸(DFFPBA)、三氯化铁六水合物、1,6-己二胺、无水醋酸钠、乙二醇、硝酸银、柠檬酸三钠、碳酸氢铵、氯化钠、醋酸、三氟乙酸(TFA)、盐酸(HCl)、氨水(28%)、无水甲醇和无水乙醇购于南京试剂公司。骨肉瘤癌症病人血清来源于江苏省南京市鼓楼医院。透射电子显微镜(TEM)实验在一台JEOL-2100F系统(JEOL)上操作完成。红外光谱(FT-IR)分析在Nicolet 6700 FT-IR光谱仪(Thermo Fisher)上完成。紫外(UV)光谱分析在NanoDrop 2000/2000C光谱仪(Thermo Fisher)

图1 (网络版彩色)分子印迹磁性纳米颗粒的制备原理图

Figure 1 (Color online) Schematic diagram of molecularly imprinted magnetic nanoparticles

上完成. 实验中所有的MALDI-TOF MS实验在一台4800 plus基质辅助激光解析电离-飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)仪(Applied Biosystem)上实现.

(ii) MALDI-TOF MS质谱条件的选择. 选用355 nm的脉冲激光, 激光能量调节到稍微高于阈值以得到好的分辨率和信噪比(S/N), 所有的质谱图都是在正离子模式下采集的, 并选用线性模式来检测蛋白, 加速电压设定为20 kV. 整个实验过程在4000 Series Explorer Software V3.7.0软件上操作完成, 采集到的数据由Data Explorer Software Version 4.5软件(Applied Biosystems)处理. 基于以上条件, 选择ALP作为被分析物, 考察了CHCA和SA两种不同基质, 浓度分别为15和10 mg/mL. 具体实验步骤为, 将ALP蛋白储备液进行梯度稀释(10, 100, 1000倍), 等量的基质和样品(1 μ L)依次滴于MALDI靶板上, 室温下结晶后进行MALDI-TOF MS分析. 由于ALP蛋白分子量为56000 Da, 质谱分析质量范围选择20000~100000 Da, 聚焦质量56000 Da. 基于质谱离子化效率, 最终选择SA作为本次实验MALDI-TOF MS分析的基质.

(iii) BA-MNPs的制备. 首先, 将2.0 g三氯化铁六水合物, 4.0 g无水醋酸钠和13.0 g 1,6-己二胺加入到60 mL乙二醇中, 搅拌均匀, 然后倒入聚四氟乙烯反应釜中, 在198℃温度下反应6 h. 得到的产物分别用水和乙醇各清洗3次, 并于50℃下真空干燥过夜, 得到氨基修饰磁性纳米粒子(amino-modified magnetic nanoparticles, AMNPs)^[41]. 取200 mg AMNPs, 加入到40 mL无水甲醇中, 超声分散, 然后加入400 mg DFFPBA和1%(w/w)氰基硼氢化钠, 室温下机械搅拌(400 r/min)24 h. 用磁铁收集得到的产物, 然后分别用水和乙醇各清洗3次, 最后在50℃真空条件下干燥过夜, 则得到制备好的BA-MNPs储存备用.

(iv) MI-MNPs的制备. 配置50 mmol/L碳酸氢铵/500 mmol/L氯化钠缓冲溶液, 调pH为8.5, 取2 mL该缓冲溶液, 加入20 mg制备好的BA-MNPs, 超声分散. 同时取1 mg模板蛋白ALP, 溶于1 mL上述缓冲溶液中, 得到ALP蛋白储备液. 然后取200 μ L的ALP蛋白储备液, 加入到分散好的BA-MNPs溶液中, 室温条件下振荡2 h, 得到固定了ALP蛋白的BA-MNPs, 用磁铁收集产物, 并用50 mmol/L碳酸氢铵缓冲溶液(pH 8.5)清洗, 得到产物1. 将产物1分散到160 mL氨水的无水乙醇溶液中(氨水含量2.8 mL), 然后加入40

mL 10 mmol/L TEOS的无水乙醇溶液, 在室温条件下缓慢搅拌50 min, 用磁铁收集产物, 并用乙醇清洗3次, 在40℃下真空干燥过夜, 得到产物2. 为了移除模板蛋白, 将20 mg产物2分散到2 mL 100 mmol/L醋酸溶液中, 室温下振荡20 min, 此过程重复3次. 移除模板后, 用磁铁收集印迹得到的MNPs, 并用乙醇清洗3次, 在40℃下真空干燥过夜, 得到最终产物MI-MNPs. 非印迹MNPs(non-imprinted magnetic nanoparticles, NIPs)的制备方法同上, 但过程中不加目标蛋白ALP, 其余步骤完全相同.

(v) BA-MNPs的亲和和选择性的考察. 配制浓度为1 mg/mL腺苷或脱氧腺苷溶液, 溶剂为50 mmol/L碳酸氢铵/500 mmol/L氯化钠缓冲溶液(pH 8.5), 取200 μ L配置好的溶液, 将2 mg BA-MNPs分散其中, 然后在室温条件下, 将混合物在振荡器上振荡2 h, 用磁铁将MNPs吸附在离心管管壁上, 分别用200 μ L 50 mmol/L碳酸氢铵/500 mmol/L氯化钠缓冲溶液(pH 8.5)和50 mmol/L碳酸氢铵缓冲溶液(pH 8.5)冲洗3次, 再重新将MNPs分散到20 μ L 100 mmol/L醋酸溶液中, 在室温下振荡1 h, 最后, 用磁铁将MNPs吸附在离心管管壁上, 收集解析液. 通过紫外(UV)检测测量解析液中被MNPs吸附的腺苷或脱氧腺苷的量, 设定UV检测波长为260 nm, 重复检测3次. 对于5种蛋白质ALP, OVA, BSA, β -casein和HRP, 配置的蛋白质溶液浓度为0.5 mg/mL, UV检测波长为214 nm, 其余步骤同上. 对于对照试验, 所有实验步骤同上, 在萃取溶液中不加入蛋白质.

(vi) MI-MNPs的选择性考察. 首先, 将ALP, OVA, BSA, β -casein和HRP五种蛋白质分别配置成浓度为0.5 mg/mL的50 mmol/L碳酸氢铵/500 mmol/L氯化钠溶液(pH 8.5), 然后分别取2 mg的MI-MNPs, 分散到200 μ L蛋白质溶液中, 在室温条件下振荡2 h, 用磁铁将溶液中的产物吸附到离心管管壁上, 分别用200 μ L 50 mmol/L碳酸氢铵/500 mmol/L氯化钠缓冲溶液(pH 8.5)和50 mmol/L碳酸氢铵缓冲溶液(pH 8.5)冲洗3次, 清洗过后, 重新将MNPs分散到20 μ L 100 mmol/L醋酸溶液中, 室温下在振荡器上振荡1 h, 最后, 用磁铁将MNPs重新吸附在离心管管壁上, 并用移液枪将离心管里的解析液转移出来. 解析组分分别进行紫外吸收测量(设定检测波长为214 nm), 并进行MALDI-TOF MS分析, 所有测量重复3次. 在对照试验中, 所有的实验步骤都与上述步骤一样, 但在

萃取溶液中不加入蛋白质。

(vii) 印迹效率考察. 取2 mg的BA-MNPs和MI-MNPs分别加入到200 μ L 0.5 mg/mL的ALP蛋白质溶液中, 溶剂为50 mmol/L碳酸氢铵/500 mmol/L氯化钠缓冲溶液(pH 8.5). 室温下振荡2 h, 用磁铁收集溶液中的MNPs, 分别用 200 μ L 50 mmol/L碳酸氢铵/500 mmol/L氯化钠缓冲溶液(pH 8.5)和50 mmol/L碳酸氢铵缓冲溶液(pH 8.5)冲洗3次, 清洗过后, 重新将MNPs分散到20 μ L 100 mmol/L醋酸溶液中, 室温下在振荡器上振荡1 h, 最后, 用磁铁将MNPs重新吸附在离心管管壁上, 并用移液枪将离心管里的解析液转移出来. 解析组分分别进行紫外吸收测量, 检测波长为214 nm. 由得到的紫外吸收强度估算BA-MNPs和MI-MNPs所吸附到的ALP的量. 将MI-MNPs吸附的ALP的量除以BA-MNPs吸附的量, 得到印迹效率. 实验重复3次.

(viii) 选择性萃取癌症病人血清中的ALP. 首先, 将骨肉瘤癌症病人的血清样品用50 mmol/L碳酸氢铵/500 mmol/L氯化钠缓冲溶液(pH 8.5)稀释10倍, 得到样品溶液, 用MALDI-TOF MS进行检测. 称取2 mg MI-MNPs, 分别加入到200 μ L上述样品溶液中, 并在室温下振荡2 h, 用磁铁将溶液中的MNPs吸附到离心管管壁上, 用200 μ L 50 mmol/L碳酸氢铵/500 mmol/L氯化钠缓冲溶液(pH 8.5)和50 mmol/L碳酸氢铵缓冲溶液(pH 8.5)分别冲洗3次, 清洗过后, 重新将MNPs分散到20 μ L 100 mmol/L醋酸溶液中, 在振荡器上室温振荡1 h, 最后, 用磁铁将MNPs重新吸附在离心管管壁上, 并用移液枪将离心管里的解析液转移出来, 得到的解析液直接用MALDI-TOF MS检测. 我们还考察了NIPs的性能, 所有步骤同上.

2 结果与讨论

2.1 MNPs的表征

实验合成得到的MNPs通过TEM进行表征, 如图2(a)~(c)所示, BA-MNPs, MI-MNPs和NIPs成圆球状, 尺寸均一, 直径约为100 nm. 由于磁核外印迹层厚度较薄(约为几个纳米), 通过TEM无法观察印迹前BA-MNPs和印迹后MI-MNPs的尺寸差别.

MI-MNPs在水溶液中分散性良好, 且通过磁铁吸附, 分散的材料能被迅速的吸附在容器壁上, 如图2(d)所示, 在移去磁铁后, 吸附在壁上的MNPs通过

图2 TEM表征. (a) BA-MNPs; (b) MI-MNPs; (c) NIPs. (d) MI-MNPs的分散和磁分离照片

Figure 2 TEM images of BA-MNPs (a), MI-MNPs (b), NIPs (c). (d) Photographs showing dispersion and magnetic separation of the MI-MNPs

简单的超声可以重新分散到溶液中.

2.2 印迹时间的选择

本文选取的目标糖蛋白为ALP, 以其糖链为实际印迹模板. ALP是一个带有2个糖基化位点的糖蛋白, 但是它的糖基化位点上可以连接至少17种不同结构的糖链, 其中有两种糖链的含量可以达到75%^[42]. 其结构如图3所示, 其尺寸用ChemBio 3D软件估算, 得到两种糖链的长度分别为3.27(图3左)与3.54 nm(图3右). 在印迹时, 为了保证得到有效的印迹空腔, 同时考虑到蛋白质结构的变异可能会导致糖链局部被包裹在蛋白质结构内, 因此选取印迹层的厚度一般为糖链长度的70%~80%. 而根据我们之

图3 (网络版彩色)模板糖链的结构

Figure 3 (Color online) The structures of the most abundant glycans of ALP

前的工作^[37], 印迹层厚度与印迹时间的关系为 $y=0.04x+0.51(R^2=0.99)$, 其中 y 为印迹层厚度(nm), x 为印迹时间(min). 因此, 我们选择印迹时间为50 min, 预估得到印迹层厚度为2.51 nm.

2.3 MNPs选择性和结合性能考察

(i) BA-MNPs的硼亲和选择性. 对于BA-MNPs的硼亲和和选择性的考察, 选择腺苷和脱氧腺苷作为测试分析物. 腺苷具有顺式二羟基结构, 能够通过硼亲和和作用被BA-MNPs抓取; 而脱氧腺苷则没有顺式二羟基结构, 因此不能被抓取. 实验结果如图4(a)所示, 从图中可以看出, BA-MNPs对腺苷有明显的抓取, 而对脱氧腺苷则没有抓取, 证明实验合成的BA-MNPs有很好的硼亲和和选择性.

选择了5种不同的蛋白质考察以上材料的硼亲和和选择性, 包括糖蛋白ALP, OVA和HRP以及非糖蛋白BSA和 β -casein. 对于糖蛋白来说, 其结构上含有具有顺式二羟基结构的糖链, 因此可以通过硼亲和和作用被抓取; 而非糖蛋白上没有顺式二羟基结构的糖链, 因此不能被抓取. 如图4(b)结果显示, 该硼亲和材料对于糖蛋白ALP, OVA和HRP有明显抓取, 而对非糖蛋白BSA和 β -casein则几乎不抓取, 说明了所制备的基础材料有良好的硼亲和和选择性.

(ii) MI-MNPs的选择性. MI-MNPs的选择性通过萃取ALP, OVA, BSA, β -casein和HRP来验证, 其中ALP作为目标蛋白, 而OVA, BSA, β -casein和HRP作为竞争蛋白. 结果如图5所示, MI-MNPs仅对ALP有明显的结合, 而对其他4种蛋白的结合量都很小, 证明MI-MNPs对ALP具有良好的特异性结合能力, 该

结果被相应的MALDI-TOF MS分析结果进一步证实(图6). 通过对比MI-MNPs和NIPs对ALP的结合量, 得到本方法的印迹因子(IF)为10.1. 印迹效率通过印迹后MI-MNPs对ALP的结合量与印迹前BA-MNPs对ALP的结合量之比计算得到, 为51.4%, 明显高于之前的工作(48.5%^[36], 43.5%^[37]和46.2%^[39]), 表明本印迹方法的效率更高.

2.4 MI-MNPs在实际样品中的应用

骨肉瘤是一种具有较高恶性程度的骨的原发性肿瘤, 其患者体内的ALP含量会发生病理性升高. 从血清样品的检测结果中, 可以发现, 即使在ALP发生病理性升高的癌症病人血清中, ALP相对含量也十分低, 从质谱图中基本上看不到(图7(a)). 但是, 经过MI-MNPs萃取后, 解析液在MALDI-TOF MS下, 信号十分明显(图7(b)). 这充分说明本文的分子印迹聚合物对于ALP蛋白的专一性识别和选择性富集能力, 即使在痕量情况下, 效果仍然十分明显. ALP在骨肉瘤癌症病人血清中的含量水平与骨肉瘤的不同病理类型有关. 同时, 对于治疗前患者体内ALP水平的检测, 具有一定的治疗预判价值, 有助于对患者治疗方案进行选择, 提高治疗效果. 因此, 本文合成的MI-MNPs对于骨肉瘤癌症病人血清中痕量ALP的成功富集, 充分展现了本方法制备的分子印迹聚合物在实际样品尤其是复杂的生物样品中重要的应用价值.

3 结论

本文提出了在有机相中以目标糖蛋白为准模板, 通过可控定向表面印迹仅印迹其糖链部分的新颖分

图4 (网络版彩色)BA-MNPs对腺苷和脱氧腺苷(a)和不同蛋白(b)的抓取结果

Figure 4 (Color online) Comparison of the amount of adenosine and deoxyadenosine (a), different proteins (b) captured by BA-MNPs

图5 (网络版彩色)MI-MNPs和NIPs对于不同蛋白的抓取结果

Figure 5 (Color online) Comparison of the amount of different proteins captured by the MI-MNPs and NIPs

子印迹方法. 以碱性磷酸酶为例, 合成了能专一识别该糖蛋白的磁性分子印迹纳米材料. 该印迹方法无须复杂的糖链模板制备步骤, 根据特征糖链结构, 通过控制印迹时间, 直接印迹完整糖蛋白上的糖链, 方法简便高效. 本方法的印迹过程中, 可以忽略有机相对目标蛋白造成的结构变化. 所得分子印迹材料对于目标糖蛋白表现出良好的特异性, 即使在复杂的实际样品中, 也可以保存这种特性. 本文方法的制备步骤简单, 制备成本低, 材料结合目标物后的释放条件也比较温和. 同时, 该方法可以扩展到其他糖蛋白的识别. 因此, 本文方法及所合成的分子印迹聚合物在疾病诊断等许多重要的领域中具有重要的应用潜力.

图6 (网络版彩色)MALDI-TOF MS检测图谱. (a) ALP, (b) OVA, (c) BSA, (d) β-casein, (e) HRP, (f) 空白. (i) 蛋白质标准品, (ii) MI-MNPs萃取的蛋白质, (iii) NIPs萃取的蛋白质

Figure 6 (Color online) MALDI-TOF MS spectra of direct analysis of proteins (i), proteins extracted by the MI-MNPs prepared (ii) and by corresponding NIPs from different samples (iii). (a) ALP, (b) OVA, (c) BSA, (d) β-casein, (e) HRP, (f) blank

图7 (网络版彩色)MALDI-TOF MS检测图谱。(a) 血清样品;(b) MI-MNPs萃取后;(c) NIPs萃取后

Figure 7 (Color online) MALDI-TOF MS spectra for the analysis of human serum. (a) Direct analysis; (b) analysis after extracted by the MI-MNPs; (c) analysis after extracted by NIPs

参考文献

- 1 Wu L, Qu X G. Cancer biomarker detection: Recent achievements and challenges. *Chem Soc Rev*, 2015, 44: 2963–2997
- 2 Dwek R A. Glycobiology: Toward understanding the function of sugars. *Chem Rev*, 1996, 96: 683–720
- 3 Ohtsubo K, Marth J D. Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. *Cell*, 2006, 126: 855–867
- 4 Chandler K, Goldman R. Glycoprotein disease markers and single protein-omics. *Mol Cell Proteomics*, 2013, 12: 836–845
- 5 Rudd P M, Wormald M R, Dwek R A. Glycosylation and the immune system. *J Protein Chem*, 1998, 17: 519–519
- 6 Morelle W, Michalski J C. Analysis of protein glycosylation by mass spectrometry. *Nat Protoc*, 2007, 2: 1585–1602
- 7 Ludwig J A, Weinstein J N. Biomarkers in cancer staging, prognosis and treatment selection. *Nat Rev Cancer*, 2005, 5: 845–856
- 8 Tian Y, Zhang H. Characterization of disease-associated n-linked glycoproteins. *Proteomics*, 2013, 13: 504–511
- 9 Bordon Y. Pattern recognition receptors picking lox to find antibodies. *Nat Rev Immunol*, 2014, 14: 716–716
- 10 Baker M. Blame it on the antibodies. *Nature*, 2015, 521: 274–276
- 11 Baker M. Antibody anarchy: A call to order. *Nature*, 2015, 527: 545–551
- 12 Wulff G, Sarhan A. The use of polymers with enzyme-analogous structures for the resolution of racemates. *Angew Chem Int Edit*, 1972, 11: 341–346
- 13 Vlatakis G, Andersson L I, Muller R, et al. Drug assay using antibody mimics made by molecular imprinting. *Nature*, 1993, 361: 645–647
- 14 Wulff G. Molecular imprinting in cross-linked materials with the aid of molecular templates—A way towards artificial antibodies. *Angew Chem Int Edit*, 1995, 34: 1812–1832
- 15 Shi H Q, Tsai W B, Garrison M D, et al. Template-imprinted nanostructured surfaces for protein recognition. *Nature*, 1999, 398: 593–597
- 16 Nishino H, Huang C S, Shea K J. Selective protein capture by epitope imprinting. *Angew Chem Int Edit*, 2006, 45: 2392–2396
- 17 Haupt K, Mosbach K. Molecularly imprinted polymers and their use in biomimetic sensors. *Chem Rev*, 2000, 100: 2495–2504
- 18 Hart B R, And D J R, Shea K J. Discrimination between enantiomers of structurally related molecules: Separation of benzodiazepines by molecularly imprinted polymers. *J Am Chem Soc*, 2000, 122: 460–465
- 19 Nematollahzadeh A, Sun W, Aureliano C S A, et al. High-capacity hierarchically imprinted polymer beads for protein recognition and capture. *Angew Chem Int Edit*, 2011, 50: 495–498
- 20 Kugimiya A, Takeuchi T. Surface plasmon resonance sensor using molecularly imprinted polymer for detection of sialic acid. *Biosens Bioelectron*, 2001, 16: 1059–1062
- 21 Fuchs Y, Soppera O, Mayes A G, et al. Holographic molecularly imprinted polymers for label-free chemical sensing. *Adv Mater*, 2013, 25: 566–570

- 22 Kunath S, Panagiotopoulou M, Maximilien J, et al. Cell and tissue imaging with molecularly imprinted polymers as plastic antibody mimics. *Adv Healthc Mater*, 2015, 4: 1322–1326
- 23 Yin D Y, Wang S S, He Y J, et al. Surface-enhanced Raman scattering imaging of cancer cells and tissues via sialic acid-imprinted nanotags. *Chem Commun*, 2015, 51: 17696–17699
- 24 Wang S S, Wen Y R, Wang Y J, et al. Pattern recognition of cells via multiplexed imaging with monosaccharide-imprinted quantum dots. *Anal Chem*, 2017, 89: 5646–5652
- 25 Liu J, Yin D Y, Wang S S, et al. Probing low-copy-number proteins in a single living cell. *Angew Chem Int Edit*, 2016, 55: 13215–13218
- 26 Sellaergren B, Allender C J. Molecularly imprinted polymers: A bridge to advanced drug delivery. *Adv Drug Deliver Rev*, 2005, 57: 1733–1741
- 27 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
- 28 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
- 29 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 Inter*, 2016, 8: 5747–5751
- 30 Bossi A, Piletsky S A, Piletska E V, et al. Surface-grafted molecularly imprinted polymers for protein recognition. *Anal Chem*, 2001, 73: 5281–5286
- 31 James T D, Sandanayake K, Shinkai S. Saccharide sensing with molecular receptors based on boronic acid. *Angew Chem Int Edit*, 1996, 35: 1910–1922
- 32 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
- 33 Liu Z, He H. Synthesis and applications of boronate affinity materials: From class selectivity to biomimetic specificity. *Accounts Chem Res*, 2017, 50: 2185–2193
- 34 Li L, Lu Y, Bie Z J, et al. Photolithographic boronate affinity molecular imprinting: A general and facile approach for glycoprotein imprinting. *Angew Chem Int Edit*, 2013, 52: 7451–7454
- 35 Ye J, Chen Y, Liu Z. A boronate affinity sandwich assay: An appealing alternative to immunoassays for the determination of glycoproteins. *Angew Chem Int Edit*, 2014, 53: 10386–10389
- 36 Wang S S, Ye J, Bie Z J, et al. Affinity-tunable specific recognition of glycoproteins via boronate affinity-based controllable oriented surface imprinting. *Chem Sci*, 2014, 5: 1135–1140
- 37 Bie Z J, 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 Edit*, 2015, 54: 10211–10215
- 38 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
- 39 Bie Z J, Xing R R, He X P, et al. Precision imprinting of glycopeptides for facile preparation of glycan-specific artificial antibodies. *Anal Chem*, 2018, 90: 9845–9852
- 40 Forneris F, Mattevi A. Enzymes without borders: Mobilizing substrates, delivering products. *Science*, 2008, 321: 213–216
- 41 Wang L Y, Bao J, Wang L, et al. One-pot synthesis and bioapplication of amine-functionalized magnetite nanoparticles and hollow nanospheres. *Chem-Eur J*, 2006, 12: 6341–6347
- 42 Bublitz R, Hoppe H, Cumme G A, et al. Structural study on the carbohydrate moiety of calf intestinal alkaline phosphatase. *J Mass Spectrom*, 2001, 36: 960–972

Summary for “完整糖蛋白为准模板的有机相中聚糖的硼亲和可控定向表面印迹”

Boronate affinity controllable oriented surface imprinting of glycans in organic phase using intact glycoproteins as semi-templates

Zhanchen Guo, Rongrong Xing, Hui He & Zhen Liu*

State Key Laboratory of Analytical Chemistry for Life Science, School of Chemistry and Chemical Engineering, Nanjing University, Nanjing 210023, China

* Corresponding author, E-mail: zhenliu@nju.edu.cn

Glycoproteins are a large family of proteins which have great biological and clinical importance including molecular recognition, signal transduction, cell adhesion and immune response. Many glycoproteins are important biomarkers for disease diagnosis and as therapeutic targets. However, glycoproteins are present in very low abundance in the body and coexist alongside interfering species present at much higher abundance. So, specific recognition of glycoproteins is of great significance. Although antibodies are commonly used to solve this issue, they are associated with some apparent drawbacks, such as, difficult to prepare, poor storage stability, high cost and requiring harsh conditions for target release. Therefore, novel alternatives are highly desirable. Molecularly imprinted polymers (MIPs), which are synthesized through polymerization in the presence of a template, exhibit specific binding towards the template molecules. A series of molecular imprinting approaches have been developed to produce glycoprotein-specific MIPs. Boronic acids can covalently bind cis-diol groups of cis-diol-containing compounds like glycoproteins and glycopeptides, to form stable five- or six-membered cyclic esters at relatively high pH values. The esters dissociate reversibly when the pH of the environment is made acidic. In recent years, our group has developed a series of boronate affinity molecular imprinting techniques for specific recognition of glycoproteins, especially boronate affinity controllable-oriented surface imprinting method. Based on silane hydrolysis in alcohol phase, this method permits getting the desired thickness of the imprinting layer according to the size of the template molecules. The method allows for easy and efficient preparation of MIPs specific to glycoproteins, glycans, and monosaccharides, enabling promising applications. Recently, we can even achieve precision imprinting of glycopeptides for the facile preparation of glycan-specific MIPs. However, the molecular imprinting of intact proteins in organic phase often results in the denature of the template proteins while imprinting approaches using glycans as the templates require relatively tedious glycan preparation procedure. Herein, we developed a new approach for imprinting in organic phase using an intact target glycoprotein as a semi-template. This method allowed for the imprinting of only the glycans on the target glycoprotein, without worrying about possible denature of the target protein in organic phase. Alkaline phosphatase (ALP), which is a glycoprotein enzyme that has been routinely used as an indicator for several diseases in clinical tests, was used as the target. ALP-specific molecularly imprinted magnetic nanoparticles (MI-MNPs) were prepared using this method. By using boronic acid-functionalized MNPs as the nanocores, the target molecules were immobilized onto the nanocores via boronate affinity. Then, a thin-layer of silica was controllably formed to cover the templates to an appropriate thickness through polycondensation of tetraethyl orthosilicate (TEOS) in ethanol. After that, the templates are removed facily by washing with an acidic solution to disrupt the boronate affinity interaction. The prepared MIPs exhibited good specificity towards ALP, and this characteristic was preserved even in a complicated real sample. The developed approach exhibited high imprinting efficiency. It overcame the limitations of previous imprinting approaches. Also, the MI-MIPs synthesized in this work were simple to prepare, stable, cost-efficient and easy to collect. Besides, the target release just needed gentle conditions. It can be a promising means to produce glycoprotein-specific MIPs for important applications such as affinity separation and disease diagnosis.

molecular imprinting, controllable imprinting, boronate affinity, magnetic nanoparticle, glycoprotein

doi: 10.1360/N972018-01006