抗原决定基印迹材料及其应用

杨开广, 李森武, 刘路宽, 陈玉宛, 周雯, 张丽华*, 张玉奎

中国科学院大连化学物理研究所, 中国科学院分离分析化学重点实验室, 大连 116023

*联系人, E-mail: lihuazhang@dicp.ac.cn

2018-10-17 收稿, 2018-12-07 修回, 2018-12-14 接受, 2019-01-30 网络版发表

国家自然科学基金(21575143)和中国科学院青年创新促进会基金(2017222)资助

摘要 基于抗体-抗原原理的蛋白质印迹材料对蛋白质的分离纯化、药物转运和细胞成像等具有十分重要的意义。其中抗原决定基印迹材料具有模板易得、构象稳定、空间位阻小等优点受到越来越多的关注和得到广泛的应用。本文重点综述了抗原决定基印迹材料的最新制备方法(包括抗原决定基本体印迹、抗原决定基接枝表面印迹、抗原决定基限域表面印迹、基于协同作用的抗原决定基表面印迹技术)以及在肽段、蛋白及细胞识别方面的应用。最后总结了抗原决定基印迹技术面临的主要问题和未来的发展方向。

关键词 分子印迹, 抗原决定基, 蛋白质, 肽段, 人工抗体

蛋白质印迹根据模板分子的不同可以分为整体蛋白印迹和抗原决定基印迹。整体蛋白印迹通常采用识别目标蛋白质作为模板分子^[1,2], 部分目标蛋白质由于样品量、成本等原因, 无法作为模板进行印迹, 这种情况下可选择与目标蛋白质结构类似的蛋白质作为替代模板进行印迹^[3]。然而, 蛋白质分子量大、体积庞大、其构象对环境变化敏感, 同时对于许多有重要生物学意义的蛋白质, 很难获得足够量的纯品蛋白质作为模板^[2-5], 这在很大程度上限制了整体蛋白印迹的发展及应用。抗原决定基是抗原表面决定其免疫原性的区域, 抗体对抗原的捕获就是通过抗体对其抗原决定基的识别进行的。以目标蛋白质抗原决定基肽段为模板的印迹, 被称为抗原决定基印迹^[6,7]。如图1所示, 该方法最早在2000年被Rachkov和Minoura^[7]报道。他们以四肽YPLG作为模板制备得到的本体印迹材料, 发现该材料不仅可识别YPLG, 还可通过末端PLG的印迹位点对末端含有PLG序列的环状九肽(CYINCPLG, 两个C间有二硫键)进行识别。由于蛋白质末端肽段与目标蛋白质序列特异性高达95%^[8,9], 印迹材料可以通过识别末端

肽段对目标蛋白质进行识别。

由于抗原决定基肽段可以进行人工合成, 且其构象较整体蛋白质更稳定, 这种以抗原决定基肽段作为模板分子的印迹策略很好地解决了蛋白质模板难获得、构象不稳定的问题。同时相对于蛋白质的中间肽段序列, 末端肽段识别时具有较小的空间位阻, 因此目前报道的蛋白质抗原决定基印迹通常采用蛋白质的末端序列作为抗原决定基。目标蛋白质的氨基末端和羧基末端均可被作为抗原决定基用于印迹。Shea课题组^[10]利用细胞色素c(Cyc)的羧基端九肽(AYLK-KATNE)、牛血清白蛋白(BSA)的羧基端九肽(VVSTQTALA)及乙醇脱氢酶(ADH)的羧基端九肽(GRYVVDTSK)为模板, 分别制备了Cyc、BSA及ADH的抗原决定基印迹膜。发现3种印迹膜分别对这3种目标蛋白质体现出很高的选择性, 可高选择性的从5种蛋白质的混合液中将其对应的目标蛋白质富集出来。本课题组^[8]以转铁蛋白的氨基端九肽为模板, 通过聚醚砜相反转自组装的方式制备得到了转铁蛋白抗原决定基印迹微球。该材料对转铁蛋白及其抗原决定基的识

引用格式: 杨开广, 李森武, 刘路宽, 等. 抗原决定基印迹材料及其应用. 科学通报, 2019, 64: 1368–1379

Yang K G, Li S W, Liu L K, et al. Recent advances and application of epitope imprinted materials (in Chinese). Chin Sci Bull, 2019, 64: 1368–1379, doi: [10.1360/N972018-01033](https://doi.org/10.1360/N972018-01033)

图1 抗原决定基印迹示意图^[7]

Figure 1 Schematic representation of epitope imprinting approach^[7]

别系数可达到3.36及4.70,并可对血浆中的转铁蛋白表现良好的识别选择性。但是考虑到蛋白质的氨基末端经常存在多种翻译后修饰^[11],羧基末端更适合作为蛋白质印迹的抗原决定基。

1 抗原决定基印迹技术

抗原决定基从分子量上来讲,分子量一般在1000~3000,介于小分子和蛋白之间。此外抗原决定基也具有一定的空间结构,因此小分子印迹的方法和整体蛋白印迹的方法在抗原决定基中都会使用。

1.1 抗原决定基本体印迹技术

本体印迹是最早用于分子印迹的方法,蛋白质印迹兴起后,最初的整体蛋白印迹方法也是本体印迹法^[12,13]。在该方法中模板分子首先与功能单体、交联剂混合形成相互作用复合物;随后在引发剂的作用下使功能单体与交联剂聚合形成分子印迹聚合物,在印

迹过程中模板分子被完全包埋于聚合物中,洗脱模板分子,形成形状与相互作用与模板蛋白质互补的印迹位点。在本体印迹中,由于模板分子被完全包埋,印迹过程中可最大限度地利用模板分子形状及其表面相互作用基团。在实际操作中,常需要将本体印迹聚合材料进行研磨处理,一方面为了将其尺寸从厘米级降低至微米级,另一方面可暴露更多的印迹位点。

相对于整体蛋白质而言,抗原决定基分子量较小、构象较稳定,在本体印迹过程中对溶剂及单体的要求没有整体蛋白印迹苛刻,因此抗原决定基印迹过程可借鉴许多较成熟的传统小分子印迹。Sellersgren课题组^[14]利用磷酸化丝氨酸作为丝氨酸磷酸肽的抗原决定基分子,通过本体印迹策略制备得到印迹材料,将该材料研磨后填入微量固相萃取柱用于磷酸化蛋白质组学磷酸肽的富集中。但是对抗原决定基本体印迹而言,由于印迹位点居于材料内部,传质阻力大,印迹后模板难去除,这导致印迹位点形成效率低。同时,蛋白质分子量大,传质速度慢,因此在识别过程中目标蛋白难以扩散进入印迹位点,导致印迹位点利用率低。这些因素都不利于抗原决定基的印迹及相应蛋白质的识别。

1.2 抗原决定基表面印迹技术

表面印迹是在印迹过程中使模板分子位于印迹材料表面附近,从而使形成的印迹位点处于印迹材料表面的印迹技术。由于印迹位点处于印迹聚合物表面,模板分子可以较容易地被去除,同时也有利于目标蛋白质进入印迹位点。这降低了模板去除及目标蛋白质识别过程中的传质阻力,提高了印迹位点的形成效率及利用效率,同时也可显著提高目标蛋白质的吸附速率和解吸附速率。按照印迹位点的形成策略,抗原决定基表面印迹表面印迹可分为接枝表面印迹、限域表面印迹及固相合成表面印迹。

1.2.1 抗原决定基接枝表面印迹

表面印迹实现的途径之一是将模板分子(整体蛋白质或抗原决定基)固定于基质材料表面,然后在基质材料表面聚合形成表面印迹层,通过控制印迹层的厚度,使模板分子被印迹层部分包被;随后去除模板分子,在基质材料表面形成印迹位点。

接枝表面印迹在核壳结构表面印迹颗粒材料的制备中应用非常广泛^[15]。如图2所示,刘震课题组^[16,17]以硼酸修饰的磁纳米颗粒作为基质材料,以糖蛋白上的糖链作为抗原决定基,利用硼酸对糖链的亲合作用实

图2 (网络版彩色)硼亲和糖链定向表面印迹材料的制备(a)及其对糖链、糖肽及糖蛋白的识别(b)^[17]

Figure 2 (Color online) Preparation of boronate-affinity glycan-oriented surface imprinted material (a) and its recognition toward glycan, glycopeptides and glycoprotein (b)^[17]

现糖链的定向固载；随后通过控制硅烷的反应时间在磁纳米颗粒表面包被合适层厚的印迹层；通过酸洗的方式破坏硼亲和作用释放模板糖链后，形成核壳结构表面印迹材料。由于不同糖蛋白上糖链结构不同，该材料对目标糖蛋白具有良好的识别选择性，印迹因子可

达到21.8，可在血浆样品中实现转铁蛋白特异性捕获。

电极表面抗原决定基印迹膜的制备也是接枝表面印迹的典型代表之一，是抗原决定基印迹材料在生化传感方面应用的基础。如图3所示，Dechtrirat等人^[18]以细胞色素C(Cyc)的羧基端九肽作为抗原决定基，在抗

图3 (网络版彩色)接枝表面印迹膜制备策略^[18]

Figure 3 (Color online) Schematic representation of the preparation of grafted surface imprinting strategy^[18]

原决定基的C端修饰半胱氨酸,通过半胱氨酸侧链巯基与金形成的Au-S键将抗原决定基固定在金电极表面。随后以7-羟基-6-甲氧基香豆素为单体,利用电化学聚合的方式在金电极表面形成分子印迹层,并通过聚合脉冲电压及脉冲次数的控制实现了印迹层厚度的精确调控。最后,用电化学剥离的方式去除抗原决定基模板。由于表面抗原决定基膜的高选择性,该电极可高选择性地识别Cyc及其抗原决定基。由于电化学聚合能精确地控制印迹层厚度,同时电极表面印迹膜也大幅增强电极的识别选择性,接枝表面印迹策略在电极表面印迹膜的制备中使用非常广泛。印迹模板包括了翻译后修饰蛋白、乙酰胆碱酯酶、以前列腺特异抗原为代表的癌症标志物^[19-21]。然而,基于Au-S键的抗原决定基固定方法及基于电化学剥离抗原决定基去除策略仅适用于金电极表面,对硅胶表面及聚合物等非电化学活性的表面则无能为力。

接枝表面印迹中,模板分子的固定及印迹层厚度的控制非常关键。模板分子固定过程中为保证形成有效的印迹位点,首先要求固定过程不会改变模板的构象。其次为增加印迹位点的密度,提高印迹材料的亲和力,要求固定过程高效,模板固载量高。再次要求固定化的模板在印迹后容易被去除。对整体蛋白质印迹而言,目前可用的蛋白质固定方法包括物理吸附固定^[22,23]、可逆共价键固定^[24,25]、金属离子螯合固定^[26,27]、硼亲和^[28-30]、特异性配基固定^[31]等。然而对抗原决定基而言,高效、通用的固定及去除方法还较

少。张丽华课题组^[32]以人工合成的His-tag修饰目标蛋白质C末端肽作为抗原决定基模板分子,通过His-tag将模板分子固载于材料表面上,从而确定模板的方向性。利用多巴胺氧化聚合可控自组装能力,通过调节多巴胺用量对印迹层的厚度进行调控。最后利用乙二醇四乙酸破坏His-tag与材料表面的金属螯合作用,形成具有方向性的抗原决定基印迹位点(图4)。所得定向抗原决定基印迹材料对抗原决定基及对应蛋白均具有很高的选择性(印迹因子分别为4.3和2.1)。相应蛋白的吸附容量可以达到41 mg/g;抗原决定基模板利用率较非定向方法提高了421%。该定向抗原决定基印迹技术提高了模板分子的利用效率,同时通过定向的方式提高了位点的识别特异性。

在接枝表面印迹层的构建过程中,印迹层的厚度调控也非常关键。若印迹层太薄,则无法充分利用模板的形状及其表面相互作用基团,不利于形成有效的印迹位点;若印迹层太厚,则模板分子被包埋在印迹层内,不利于模板去除及目标蛋白再识别。相对于传统的自由基聚合,表面引发的活性/可控自由基聚合可得到分布均匀、厚度可控的表面聚合物层,其中原子转移自由基聚合(ATRP)、可逆加成-断裂链转移(RAFT)等活性可控聚合技术已在核壳结构颗粒材料的制备中获得广泛应用^[33-37],控制硅胶溶胶-凝胶反应、多巴胺自组装等也是常用的构建可控印迹层的方式^[32]。

1.2.2 抗原决定基限域表面印迹

限域表面印迹是将模板分子固定在基质材料表面

图4 (网络版彩色)组氨酸标签修饰抗原决定基定向表面印迹磁性纳米颗粒的制备及其对目标蛋白的识别^[32]

Figure 4 (Color online) Preparation of His-tag anchored epitope oriented surface imprinted magnetic nanoparticles and its recognition toward target protein^[32]

后,利用一定的方式将聚合反应限制在一定的区域内进行,随后通过牺牲基质材料的方式将固定在其上的模板分子去除,形成与基质材料形貌互补的印迹聚合物。在去除基质材料后,印迹位点经历了“inside-out”的过程,从而使印迹位点分布于互补表面^[38]。与接枝表面印迹相比,限域表面印迹策略不需要控制印迹层的厚度。同时,由于利用牺牲基质法去除模板,该策略对模板固定方法没有过多限制,使模板固定过程有了更多选择。

分级印迹法是限域表面印迹的经典方法,最早出现在蛋白质印迹上。其原理是以大孔硅胶作为基质材料,首先将模板分子固定于大孔硅胶孔道表面,随后将印迹溶液灌注到大孔硅胶孔道内,引发聚合后利用氢氟酸将大孔硅胶溶解,形成形貌与大孔硅胶完全互补的印迹材料。在整个印迹过程中模板分子都处于基质材料与印迹聚合物的界面处,去除基质及模板后,印迹位点暴露在印迹聚合物的表面。为实现激肽原特异性肽段的捕获,董襄朝课题组^[39]以该特异性肽段的羧基端七肽作为抗原决定基,利用分级印迹法,依靠金属螯合提供识别作用力,制备得到抗原决定基印迹材料。该材料可实现人血浆中标准激肽原特异性肽段的富集。此前,该研究组^[40,41]还将该策略应用于乙酰化肽段的抗原决定基印迹中。此外, Sellergren课题组^[42,43]也在分级策略制备人血白蛋白(HSA)及免疫球蛋白G(Ig G)印迹材料方面做了大量工作。此策略制备所得印迹材料其实是基质材料孔隙的填充物,因此其形貌完全依赖于基质材料,无法对材料形貌进行有效调控。由于大孔的存在,该策略制备所得材料存在机械强度不高的问题。

薄膜表面印迹策略是另一种应用广泛的限域表面印迹方法^[44]。该策略中,首先将模板固定在平板表面,随后在该表面进行聚合,在平板与聚合物膜的界面处产生印迹位点;聚合后移除平板,并洗脱模板分子后,使位点暴露于聚合膜表面。Shea课题组^[10]将Cyc, 牛血清白蛋白(BSA)及乙醇脱氢酶(ADH)的抗原决定基利用酰胺键固定于玻璃板表面,通过薄膜表面印迹策略制备得到抗原决定基印迹膜。该膜可高选择性地从5种蛋白的混合液中将其对应的目标蛋白富集出来。相对于颗粒材料,印迹薄膜更容易与芯片整合,因此薄膜印迹策略在生物诊断芯片领域具有很好的应用潜力。然而,由于膜材料比表面积较低、机械强度不足,这制约了薄膜印迹策略在样品预处理领域的应用。

图5 (网络版彩色)组氨酸标签印迹增强型IMAC材料的制备及其对组氨酸标签蛋白的特异性识别^[51]

Figure 5 (Color online) Preparation of His-tag imprinting enhanced IMAC (EI-IMAC) and its recognition toward His-tagged protein^[51]

基于皮克林乳液聚合法制备表面印迹颗粒材料的方法是近年来发展起来的一种新型限域表面印迹策略。皮克林乳液是由吸附在油水两相界面的固体微粒稳定的乳液体系,包括油包水(O/W)和水包油(W/O)等乳液类型^[45]。2011年, Shen和Ye^[46]首次报道利用皮克林乳液聚合法制备 β -受体阻断药物普萘洛尔表面印迹微球,并获得了理想的识别效果。同年,该策略被拓宽至心得安及血红蛋白(Hb)水相本体印迹微球的制备^[47]。在2015年,该研究组^[48]利用该策略成功制备血红蛋白(Hb)表面印迹材料。基于皮克林乳液聚合法制备表面印迹颗粒材料的方法一般为:首先将模板分子固定在 SiO_2 纳米粒子表面,随后以此纳米粒子作为稳定剂制备水包油乳液,其中油相含有引发剂及交联剂,水相还有功能单体;引发聚合后,油相内交联剂与模板蛋白相互作用的功能单体聚合形成聚合物微球;最后利用氢氟酸溶解 SiO_2 纳米粒子,去除模板蛋白,使印迹位点暴露于微球表面。

Zhang等人^[49]以 β -酪蛋白的抗原决定基,免疫刺激六肽(IHH)作为模板分子,通过皮克林乳液聚合法制备了表面印迹磁性微球,用于IHH的快速识别和释放。由于聚合反应被限域在乳液内进行,基于皮克林乳液聚合的表面印迹技术无需对印迹层厚度进行控制;另外,相对于分级印迹,该策略不依赖于基质材料的形貌,具有可通过调节固体稳定剂的亲疏水性及浓度对乳液的

类型(W/O或O/W)及乳液大小进行调节的优势,从而实现调节印迹材料粒径的目的^[50],这为形貌可控的表面印迹颗粒材料的制备提供了新思路。虽然目前仅有少数几篇利用该策略的整体蛋白印迹文章,而抗原决定基印迹的相关文章更少,但是该策略仍不失为一种极具潜力的表面印迹方法。

1.2.3 基于协同作用的抗原决定基表面印迹技术

从识别机理来说,抗原决定基分子印迹主要是通过化学配伍实现对目标分子的选择性识别。由于抗原决定基肽段的构成相对单一,此处的化学配伍作用力主要为氢键作用力、范德华力以及疏水作用力等非共价键作用力。较传统小分子印迹而言,抗原决定基肽段与基质单体之间的作用力普遍较弱,特异性较低。这也是许多传统小分子印迹材料已经商品化,且在手性分离和固相萃取中发挥着一定作用,而生物分子印迹材料在实际应用中较少的重要原因。针对这一问题,张丽华课题组^[51,52]发展了基于协同作用的抗原决定基表面印迹技术:在抗原决定基表面印迹的基础上,在位点内引入金属离子,利用金属螯合和抗原决定基印迹的协同作用力,进一步提高识别位点的结合力,实现目标蛋白质的高选择性富集。如图5所示,以重组蛋白端基的His-tag作为抗原决定基型的模板分子,首先通过 Ni^{2+} 将抗原决定基固定在基质材料表面,其次通过活性可控聚合制备层厚可控的聚合物层,最后通过咪唑将His-tag模板从印迹位点处洗脱下来,而 Ni^{2+} 保留在了抗原决定基印迹位点内,从而借助金属螯合作用力提高印迹位点的特异结合能力。通过Scatchard分析,印迹位点结合力常数(K_a)从 $1.27 \times 10^5 \text{ L/mol}$ 提高至 $2.38 \times 10^6 \text{ L/mol}$ 。

2 抗原决定基材料的应用

抗原决定基印迹材料发展较晚,目前已在非翻译后蛋白质、翻译后修饰蛋白质及肽段、和细胞识别方面取得应用,但是这方面还没有相关综述,本部分重点介绍抗原决定基印迹材料的应用。

2.1 肽段的识别

目标肽段的特异性识别在肽类疾病标志物的检测、翻译后修饰肽段的富集中发挥着重要作用。随着翻译后修饰蛋白质组学对样品富集要求的不断提高及分子印迹技术的发展,近年来分子印迹技术开始被用于翻译后修饰肽段的富集。与整体蛋白印迹不同,抗原决定基印迹材料可对具有同种抗原决定基的目标蛋白

质进行共同识别,这为利用分子印迹材料富集同类翻译后修饰蛋白质提供了理论支持。

2008年,Sellergren课题组^[53]首次报道了分子印迹材料用于磷酸化肽富集方面的工作。由于磷酸化蛋白质中酪氨酸磷酸化水平较丝氨酸及苏氨酸磷酸化低2个数量级,常规富集手段很难高选择性的富集实际样品中的酪氨酸磷酸化肽段。针对此问题,Sellergren课题组以磷酸化酪氨酸为模板,成功制备了可特异性识别酪氨酸磷酸化肽段的整体印迹材料。2011年该课题组^[14]详细对比了磷酸化酪氨酸印迹材料与传统 TiO_2 材料对不同磷酸化位点的磷酸肽的富集能力,结果发现印迹材料对酪氨酸磷酸化肽段的富集选择性更高,亲和力更强,可实现50 fmol酪氨酸磷酸肽的富集。2015年,该课题组^[54]结合强阳离子交换色谱(SCX)分级与磷酸化酪氨酸/丝氨酸印迹材料富集技术,对人胚胎肾细胞HEK-293T,人神经上皮瘤细胞SH-SY5Y,鼠脑及人脑髓液蛋白酶解产物进行了分析。结果显示相对于SCX/ TiO_2 方法(230条),该方法可鉴定出更多磷酸化肽(924条),且不存在序列歧视效应。但该印迹材料通过本体印迹策略制得,模板去除过程耗时,存在模板泄漏的可能性,同时材料形貌不均一,这些不足限制了其在磷酸化蛋白质组分析中的进一步应用。

近两年分子印迹技术也逐渐应用在乙酰化肽段的识别中。组蛋白H4上K16位的乙酰化具有调节染色体高级结构及染色体纤维与非组蛋白相互作用的功能,具有重要的生物学意义^[55,56]。为实现K16位乙酰化肽段(H4-K16ac)的富集,前述中提到董襄朝课题组^[40]以H4-K16ac(GGAKacR)作为模板,利用分级印迹策略制备得到GGAKacR印迹材料,研究结果表面该材料可高选择性富集实际样品中的掺标肽段H4-K16ac(GGAKacR),H4-K12/16ac(GLGKacGGAKacR)及H4-K5/8/12/16ac(GKacGGKacGLGKacGGAKacR)。在董襄朝课题组^[57]后期的工作中,利用乙酰化二肽KacA作为模板将该方法拓宽至含乙酰化序列KacA的肽段的富集中,并将该材料用于实际样品细胞裂解液中赖氨酸乙酰化(Kac)肽段的富集,使赖氨酸乙酰化肽段鉴定数量提高近4倍。

虽然目前分子印迹材料已在翻译后蛋白质组学样品预处理中取得应用,但在实际样品中的应用报道屈指可数。究其原因,一方面目前印迹材料对翻译后修饰肽段识别的选择性和亲和力仍然不高,导致其在实际样品中应用时抗干扰能力差。另一方面,目前仅在少量

几种翻译后修饰肽段(磷酸化、乙酰化)样品中,实现了多种肽段的同时富集^[54,57].

2.2 蛋白质的识别

自抗原决定基印迹方法建立至今,大量的工作利用目标蛋白质的末端肽段作为抗原决定基进行印迹并将其用在目标蛋白质的识别及重要疾病标志物的检测中. 血浆中血管紧张素(Ang) I 及 II 的检测对高血压、低血压相关疾病的诊断意义重大. 为实现Ang I 及Ang II 的富集及检测, Tan等人^[58]以Ang I 及Ang II 的共有末端肽VRD为抗原决定基, 在 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ NPs 表面包被了Ang的分子印迹层. 利用印迹材料的磁性实现了血浆中Ang I 及Ang II 的快速富集, 结合UPLC-MS/MS多反应检测(MRM)技术实现了富集产物的高灵敏分析. 该策略对Ang I 及Ang II 的检测限可低至0.07及0.06 ng/mL. Yang等人^[59]以牛血清白蛋白(BSA)为模型, 利用其羧基端九肽作为抗原决定基, 选择硅胶包被的CdTe量子点作为基质材料, 通过表面印迹的策略制备得到了BSA的抗原决定基印迹纳米材料. 该纳米材料对目标蛋白质体现出良好的选择性, 利用CdTe量子点吸附蛋白后荧光淬灭的特性, 可实现牛血浆中BSA的直接定量分析. 随后, 李文友课题组^[60]以Cyc的氨基端九肽及羧基端九肽作为双抗原决定基, 制备了温敏型Cyc抗原决定基表面印迹的量子点材料, 该材料对Cyc的检测限低至89 nmol/L.

若待识别的目标为多个蛋白质时, 仅选择某个蛋白质的特征性片段作为抗原决定基进行印迹无法满足多种目标蛋白质同时识别的需求. 此时, 可将多个待识别目标蛋白质的抗原决定基肽段混合后共同印迹, 以实现多目标蛋白质的共同识别. 为实现血浆中前3种高丰度蛋白的同时识别, 如图6所示, 张丽华课题组^[9]将人血白蛋白(HSA)氨基端九肽、免疫球蛋白G(Ig G)氨基端九肽及转铁蛋白(Transferrin)氨基端九肽以21:5:2混合后作为混合模板, 通过聚醚砜相反转技术制备得到多抗原决定基印迹微球, 首次利用多模板印迹技术实现了血浆中前3种高丰度蛋白的同时识别.

此外, 针对翻译后修饰蛋白组学中糖蛋白丰度低、难富集的问题, 近年来基于分子印迹策略的糖蛋白富集技术成为研究热点. 分子印迹材料识别糖蛋白方面的研究始于2013年^[61], 刘震课题组^[17,61-65]在这方面做了大量的工作. 2015年该课题组^[16]利用PNGase F酶释放核糖核酸酶B(RNB)的N-连接糖链, 随后用硼酸

图6 (网络版彩色)多抗原决定基模板印迹微球的制备及其在多目标蛋白同时捕获中的应用^[8]

Figure 6 (Color online) Fabrication of multi-epitope templates imprinted particles and application in the simultaneous capture of various target proteins^[8]

修饰的磁纳米颗粒固定被释放的糖链, 并以此作为模板制备磁性表面印迹材料, 可在血浆样品中实现转铁蛋白特异性捕获.

2.3 细胞的识别

针对细胞, 尤其是癌细胞的特异性识别是临床检验及靶向治疗的重要环节. 癌细胞表面存在大量异常表达的唾液酸糖链, 其检测对癌症的早期治疗及诊疗至关重要. 为实现细胞表面唾液酸糖链的识别及标记检测, Sellergren课题组^[66]以唾液酸(SA)作为模板分子, 将荧光分子硝基苯并-2-氧杂-1,3-二唑(NBD)修饰的单体参入聚合体系, 制备了荧光标记的SA表面印迹纳米粒子. 该纳米粒子对唾液酸的吸附亲和力高于葡萄糖酸、岩藻糖、乙酰半乳糖氨等, 并可实现细胞表面唾液酸糖链的标记; 但从标记结果来看, 标记效果仍然低于目前商品化标记试剂. 随后, Wang等人^[67]利用癌细胞表面细胞表面SA糖链过表达的特性, 以SA, 岩藻糖及甘露糖作为模板分子, 制备寡糖印迹的异硫氰酸荧光素掺杂 SiO_2 纳米粒子, 如图7所示. 该印迹纳米粒子以唾液酸糖链作为识别分子, 可实现癌细胞的特异性识别, 并可利用印迹纳米粒子的荧光性质实现癌细胞的成像. 成像结果显示, 该印迹纳米粒子对人肝癌细胞Hep G-2及乳腺癌细胞MCF-7成像时的荧光响应强于

图7 (网络版彩色)寡糖印迹纳米粒子用于癌细胞成像示意图^[67]

Figure 7 (Color online) Schematic of cancer cells imaging with monosaccharide-imprinted NPs^[67]

正常肝细胞L-02及乳腺上皮细胞MCF-10A,说明印迹纳米粒子对癌细胞具有良好的选择性,有望成为癌细胞成像的新型探针。

在细胞识别方面,适配体技术是另一种常用的人工抗体技术^[68]。该技术可以通过筛选得到能够与靶标分子高特异性、高亲和力结合的单链DNA或者RNA寡核苷酸。与抗原决定基分子印迹技术相比,两者在细胞上的识别位点均为细胞表面特异性表达的抗原,对特定细胞均具有可体外筛选、易于化学合成和修饰、稳定性高的优势。但是细胞表面特异性表达蛋白易随生理过程发生变化(例如,循环肿瘤细胞标志蛋白EpCAM在EMT过程中会发生明显下调^[69]),从而导致这两种方法均无法对目标细胞进行有效捕获,临床应用时易造成假阴性结果。为解决这一问题,在细胞识别方面,抗原决定基印迹技术面向以整体细胞为模板的印迹技术^[70],而适配技术,以整个细胞为靶标进行筛选^[71],从而摆脱对细胞表面的单一抗原的依赖。

3 结语

抗原决定基印迹材料具有稳定性高、可设计性强、易于规模化制备等优点,在目标蛋白质的特异性识别和捕获中具有较好的应用前景。然而,目前抗原决定基印迹材料的发展仍受其识别亲和力、选择性和抗干扰能力的制约,这是未来发展亟须解决的关键问题。在印迹位点内引入其他识别作用力,利用多种作用力协同识别,有望解决这一问题。此外,仍需加强抗原决定基分子印迹材料识别机理的研究。利用核磁、原位红外、荧光等方式研究印迹过程中模板和单体之间相互作用的变化,将有助于了解印迹位点的形成过程,为形成印迹位点过程中各参数的选择提供理论指导。只有深入理解印迹位点形成过程中模板分子与聚合物间的特异性相互作用,才能发现影响印迹材料识别亲和力及选择性的关键因素,从而通过导向性地合成功能单体、设计印迹模板,以及选择聚合策略,提高位点的识别特异性。

参考文献

- Chen L, Wang X, Lu W, et al. Molecular imprinting: Perspectives and applications. *Chem Soc Rev*, 2016, 45: 2137–2211
- Yang K, Zhang L, Liang Z, et al. Protein-imprinted materials: Rational design, application and challenges. *Anal Bioanal Chem*, 2012, 403: 2173–2183

- 3 Liu J, Deng Q, Tao D, et al. Preparation of protein imprinted materials by hierarchical imprinting techniques and application in selective depletion of albumin from human serum. *Sci Rep*, 2014, 4: 5487
- 4 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
- 5 Liu L, Yang K, Zhang L, et al. Protein-imprinted material for the treatment of antibiotic-resistant bacteria. *Sci Bull*, 2016, 61: 1890–1891
- 6 Rachkov A, Minoura N. Recognition of oxytocin and oxytocin-related peptides in aqueous media using a molecularly imprinted polymer synthesized by the epitope approach. *J Chromatogr A*, 2000, 889: 111–118
- 7 Rachkov A, Minoura N. Towards molecularly imprinted polymers selective to peptides and proteins. The epitope approach. *Biochim Biophys Acta (BBA) Protein Struct Mol Enzymol*, 2001, 1544: 255–266
- 8 Yang K, Liu J, Li S, et al. Epitope imprinted polyethersulfone beads by self-assembly for target protein capture from the plasma proteome. *Chem Commun*, 2014, 50: 9521–9524
- 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 Nishino H, Huang C S, Shea K J. Selective protein capture by epitope imprinting. *Angew Chem Int Ed*, 2006, 45: 2392–2396
- 11 Chen L, Shan Y, Weng Y, et al. Depletion of internal peptides by site-selective blocking, phosphate labeling, and TiO₂ adsorption for in-depth analysis of C-terminome. *Anal Bioanal Chem*, 2016, 408: 3867–3874
- 12 Liu J, Deng Q, Yang K, et al. Macroporous molecularly imprinted monolithic polymer columns for protein recognition by liquid chromatography. *J Sep Sci*, 2010, 33: 2757–2761
- 13 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
- 14 Helling S, Shinde S, Brosseron F, et al. Ultratrace enrichment of tyrosine phosphorylated peptides on an imprinted polymer. *Anal Chem*, 2011, 83: 1862–1865
- 15 Wan L, Chen Z, Huang C, et al. Core-shell molecularly imprinted particles. *TrAC Trends Anal Chem*, 2017, 95: 110–121
- 16 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
- 17 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
- 18 Dechtrirat D, Jetzschmann K J, Stöcklein W F M, et al. Protein rebinding to a surface-confined imprint. *Adv Funct Mater*, 2012, 22: 5231–5237
- 19 Dechtrirat D, Gajovic-Eichelmann N, Bier F F, et al. Hybrid material for protein sensing based on electrosynthesized MIP on a mannose terminated self-assembled monolayer. *Adv Funct Mater*, 2014, 24: 2233–2239
- 20 Jetzschmann K J, Jägerszki G, Dechtrirat D, et al. Vectorially imprinted hybrid nanofilm for acetylcholinesterase recognition. *Adv Funct Mater*, 2015, 25: 5178–5183
- 21 Jolly P, Tamboli V, Harniman R L, et al. Aptamer-MIP hybrid receptor for highly sensitive electrochemical detection of prostate specific antigen. *Biosens Bioelectron*, 2016, 75: 188–195
- 22 Gao R, Mu X, Hao Y, et al. Combination of surface imprinting and immobilized template techniques for preparation of core-shell molecularly imprinted polymers based on directly amino-modified Fe₃O₄ nanoparticles for specific recognition of bovine hemoglobin. *J Mater Chem B*, 2014, 2: 1733–1741
- 23 Li Q, Yang K, Liang Y, et al. Surface protein imprinted core-shell particles for high selective lysozyme recognition prepared by reversible addition-fragmentation chain transfer strategy. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2014, 6: 21954–21960
- 24 Shiomi T, Matsui M, Mizukami F, et al. A method for the molecular imprinting of hemoglobin on silica surfaces using silanes. *Biomaterials*, 2005, 26: 5564–5571
- 25 Gao R, Kong X, Wang X, et al. Preparation and characterization of uniformly sized molecularly imprinted polymers functionalized with core-shell magnetic nanoparticles for the recognition and enrichment of protein. *J Mater Chem*, 2011, 21: 17863–17871
- 26 Liu J, Yang K, Deng Q, et al. Preparation of a new type of affinity materials combining metal coordination with molecular imprinting. *Chem Commun*, 2011, 47: 3969–3971
- 27 Li Q, Yang K, Li S, et al. Preparation of surface imprinted core-shell particles via a metal chelating strategy: Specific recognition of porcine serum albumin. *Microchim Acta*, 2016, 183: 345–352
- 28 Gao F X, Ma X T, He X W, et al. Smart surface imprinting polymer nanospheres for selective recognition and separation of glycoprotein. *Colloids Surf A-Physicochem Eng Aspects*, 2013, 433: 191–199
- 29 Tretjakov A, Syritski V, Reut J, et al. Molecularly imprinted polymer film interfaced with Surface Acoustic Wave technology as a sensing platform for label-free protein detection. *Anal Chim Acta*, 2016, 902: 182–188

- 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 Tamboli V K, Bhalla N, Jolly P, et al. Hybrid synthetic receptors on MOSFET devices for detection of prostate specific antigen in human plasma. *Anal Chem*, 2016, 88: 11486–11490
- 32 Li S, Yang K, Liu J, et al. Surface-imprinted nanoparticles prepared with a His-tag-anchored epitope as the template. *Anal Chem*, 2015, 87: 4617–4620
- 33 Yang K, Huang X, Zhu M, et al. Combining RAFT polymerization and thiol-ene click reaction for core-shell structured polymer@BaTiO₃ nanodielectrics with high dielectric constant, low dielectric loss, and high energy storage capability. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2014, 6: 1812–1822
- 34 Liu J, Yang K, Qu Y, et al. An efficient approach to prepare boronate core-shell polymer nanoparticles for glycoprotein recognition via combined distillation precipitation polymerization and RAFT media precipitation polymerization. *Chem Commun*, 2015, 51: 3896–3898
- 35 Dine E J, Ferjaoui Z, Roques-Carnes T, et al. Efficient synthetic access to thermo-responsive core/shell nanoparticles. *Nanotechnology*, 28: 125601
- 36 Coumes F, Beauté L, Domurado D, et al. Self-assembly of well-defined triblock copolymers based on poly(lactic acid) and poly(oligo(ethylene glycol) methyl ether methacrylate) prepared by ATRP. *RSC Adv*, 2016, 6: 53370–53377
- 37 Zhou T, Jørgensen L, Mattheberg M A, et al. Molecularly imprinted polymer beads for nicotine recognition prepared by RAFT precipitation polymerization: A step forward towards multi-functionalities. *RSC Adv*, 2014, 4: 30292–30299
- 38 Linares A V, Vandevelde F, Pantigny J, et al. Polymer films composed of surface-bound nanofilaments with a high aspect ratio, molecularly imprinted with small molecules and proteins. *Adv Funct Mater*, 2009, 19: 1299–1303
- 39 Tang A, Duan L, Liu M, et al. An epitope imprinted polymer with affinity for kininogen fragments prepared by metal coordination interaction for cancer biomarker analysis. *J Mater Chem B*, 2016, 4: 7464–7471
- 40 Yang F, Lin S, Dong X. An artificial receptor synthesized by surface-confined imprinting for the recognition of acetylation on histone H4 K16. *Chem Commun*, 2015, 51: 7673–7676
- 41 Yang X, Dong X, Zhang K, et al. A molecularly imprinted polymer as an antibody mimic with affinity for lysine acetylated peptides. *J Mater Chem B*, 2016, 4: 920–928
- 42 Nematollahzadeh A, Lindemann P, Sun W, et al. Robust and selective nano cavities for protein separation: An interpenetrating polymer network modified hierarchically protein imprinted hydrogel. *J Chromatogr A*, 2014, 1345: 154–163
- 43 Nematollahzadeh A, Sun W, Aureliano C S A, et al. High-capacity hierarchically imprinted polymer beads for protein recognition and capture. *Angew Chem Int Ed*, 2011, 50: 495–498
- 44 Kryscio D R, Peppas N A. Surface imprinted thin polymer film systems with selective recognition for bovine serum albumin. *Anal Chim Acta*, 2012, 718: 109–115
- 45 Chevalier Y, Bolzinger M A. Emulsions stabilized with solid nanoparticles: Pickering emulsions. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Aspects*, 2013, 439: 23–34
- 46 Shen X, Ye L. Interfacial molecular imprinting in nanoparticle-stabilized emulsions. *Macromolecules*, 2011, 44: 5631–5637
- 47 Shen X, Zhou T, Ye L. Molecular imprinting of protein in Pickering emulsion. *Chem Commun*, 2012, 48: 8198–8200
- 48 Zhou T, Zhang K, Kamra T, et al. Preparation of protein imprinted polymer beads by Pickering emulsion polymerization. *J Mater Chem B*, 2015, 3: 1254–1260
- 49 Zhang X, Hu X, Guan P, et al. Immunostimulating peptide interfacial imprinted magnetic microspheres synthesized via Pickering emulsion polymerization. *J Mater Sci*, 2016, 52: 4713–4726
- 50 Yang J, Li Y, Wang J, et al. Molecularly imprinted polymer microspheres prepared by Pickering emulsion polymerization for selective solid-phase extraction of eight bisphenols from human urine samples. *Anal Chim Acta*, 2015, 872: 35–45
- 51 Li S, Yang K, Zhao B, et al. Epitope imprinting enhanced IMAC (EI-IMAC) for highly selective purification of His-tagged protein. *J Mater Chem B*, 2016, 4: 1960–1967
- 52 Li S, Yang K, Deng N, et al. Thermoresponsive epitope surface-imprinted nanoparticles for specific capture and release of target protein from human plasma. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2016, 8: 5747–5751
- 53 Emgenbroich M, Borrelli C, Shinde S, et al. A phosphotyrosine-imprinted polymer receptor for the recognition of tyrosine phosphorylated peptides. *Chem Eur J*, 2008, 14: 9516–9529
- 54 Chen J, Shinde S, Koch M H, et al. Low-bias phosphopeptide enrichment from scarce samples using plastic antibodies. *Sci Rep*, 2015, 5: 11438
- 55 Shogren-Knaak M, Ishii H, Sun J M, et al. Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions. *Science*, 2006, 311: 844–847
- 56 Grunstein M. Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature*, 1997, 389: 349–352
- 57 Yang X, Dong X, Zhang K, et al. Molecularly Imprinted polymer as antibody mimic with affinity for lysine acetylated peptides. *J Mater Chem B*,

- 2015, 4: 920–928
- 58 Tan L, Yu Z, Zhou X, et al. Antibody-free ultra-high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry measurement of angiotensin I and II using magnetic epitope-imprinted polymers. *J Chromatogr A*, 2015, 1411: 69–76
- 59 Yang Y Q, He X W, Wang Y Z, et al. Epitope imprinted polymer coating CdTe quantum dots for specific recognition and direct fluorescent quantification of the target protein bovine serum albumin. *Biosens Bioelectron*, 2014, 54: 266–272
- 60 Li D Y, Zhang X M, Yan Y J, et al. Thermo-sensitive imprinted polymer embedded carbon dots using epitope approach. *Biosens Bioelectron*, 2016, 79: 187–192
- 61 Li L, Lu Y, Bie Z, et al. Photolithographic boronate affinity molecular imprinting: A general and facile approach for glycoprotein imprinting. *Angew Chem Int Ed*, 2013, 52: 7451–7454
- 62 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*, 2013, 86: 959–966
- 63 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
- 64 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
- 65 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
- 66 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
- 67 Wang S, Yin D, Wang W, et al. Targeting and imaging of cancer cells via monosaccharide-imprinted fluorescent nanoparticles. *Sci Rep*, 2016, 6: 22757
- 68 Liu L, Yang K, Zhu X, et al. Aptamer-immobilized open tubular capillary column to capture circulating tumor cells for proteome analysis. *Talanta*, 2017, 175: 189–193
- 69 Massagué J, Obenauf A C. Metastatic colonization by circulating tumour cells. *Nature*, 2016, 529: 298–306
- 70 Lv S W, Liu Y, Xie M, et al. Near-infrared light-responsive hydrogel for specific recognition and photothermal site-release of circulating tumor cells. *ACS Nano*, 2016, 10: 6201–6210
- 71 Zmay G S, Kolovskaya O S, Zmay T N, et al. Aptamers selected to postoperative lung adenocarcinoma detect circulating tumor cells in human blood. *Mol Ther*, 2015, 23: 1486–1496

Summary for “抗原决定基印迹材料及其应用”

Recent advances and application of epitope imprinted materials

Kaiguang Yang, Senwu Li, Lukuan Liu, Yuwan Chen, Wen Zhou, Lihua Zhang^{*} & Yukui Zhang

Key Laboratory of Separation Sciences for Analytical Chemistry, Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China

^{*}Corresponding author, E-mail: lihuazhang@dicp.ac.cn

As artificial antibodies, protein-imprinted materials offer many advantages such as long-term storage stability, potential reusability, resistance to harsh environments and low cost. However, they suffer from obvious disadvantages, when whole proteins are used as templates. First, it is difficult to retain the native conformation of template proteins during the polymerization process. Second, it is unavailable to obtain pure proteins, especially low abundance proteins as the templates. Third, the relatively large imprinted sites are able to bind a range of smaller non-targets, resulting in reduced selectivity. Epitopes are the regions within the structures of globular proteins that can be classified as antigenic determinants. The epitope's structural specificity usually represents the entire protein. And, they can be easily obtained through artificial synthesis. Currently, as an alternative to the target protein, epitopes have been successfully employed as templates to fabricate the recognition sites for several proteins. Compared with protein templates, epitope templates are much more robust and stable during the imprinting process. Moreover, epitope templates could be obtained in large scale with low cost, even for the rare proteins. In this review, we critically and comprehensively survey recent advances and applications in epitope imprinting.

The epitope imprinting techniques have been developed into several formats, epitope bulk imprinting, grafted epitope surface imprinting, constrained epitope surface imprinting and synergic epitope surface imprinting according to how the template is presented in the imprinted materials. For the epitope bulk imprinting, binding sites were formed throughout a bulk material. The grafted epitope surface imprinting is achieved by immobilizing epitope on the film or particle surface and then polymerizing with monomers and crosslinkers to form a state-of-the-art recognition sites on the polymer or silica surface. In the constrained epitope surface imprinting, the epitope is confined between the matrix support and the final polymer matrix. Then the matrix support is removed to expose the recognition sites, usually by simply peeling imprinted polymer from the matrix or dissolving the matrix. To improve the affinities and selectivity, additional affinities were integrated into the epitope imprinted surface, which results in the technique of synergic epitope surface imprinting.

More recently, application of epitope-imprinted materials has also increased substantially with the rapid development of the life sciences, although they are not as widely used as whole protein molecule imprinting. These are demonstrated in the aspect of the peptide recognition, protein recognition and cell recognition. Finally, we summarized the remaining challenges arising from the intrinsic properties of epitope imprinting, and proposed its future development direction.

molecular imprinting, epitope, protein, peptide, artificial antibody

doi: [10.1360/N972018-01033](https://doi.org/10.1360/N972018-01033)