表面具有非交联结构糖蛋白识别位点的分子印迹聚合物微球的可控制备

黄丽洁, 郑从光, 张会旗*

南开大学化学学院, 天津化学化工协同创新中心, 功能高分子材料教育部重点实验室, 药物化学生物学国家重点实验室, 天津 300071

* 联系人, E-mail: zhanghuiqi@nankai.edu.cn

2018-10-08 收稿, 2018-11-29 修回, 2018-12-03 接受, 2019-02-13 网络版发表

国家自然科学基金(21574070, 21774063)和天津市自然科学基金重点项目(16JCZDJC36800)资助

摘要 将原子转移自由基沉淀聚合技术、表面锚定糖蛋白策略及表面引发的可控自由基聚合方法相结合, 发展了一种简便高效地制备表面具有(由亲水性聚合物刷形成的)非交联结构糖蛋白(卵清蛋白(OVA))识别位点的分子印迹聚合物(MIP)微球的新方法. 对所得具有不同非交联印迹壳层厚度的MIP微球的形貌、化学结构、表面亲水性及模板吸附性能进行了系统研究. 结果表明, 该方法可高效制备在水溶液中对OVA具有优异识别性能的MIPs. 随着MIP微球表面亲水性聚合物刷的引入, 其表面亲水性与水相分散稳定性明显提高; 同时亲水性聚合物刷的长度亦对MIPs的模板吸附性能有显著影响: 只有当亲水性聚合物刷长度与OVA粒径加上微球表面修饰的苯硼酸基的总长度相近时, MIP微球对OVA的吸附容量与专一性吸附方能达到最优; 此外, 该MIP还具有良好的OVA选择性.

关键词 分子印迹聚合物, 糖蛋白, 表面锚定, 可控表面印迹, 亲水性聚合物刷, 未交联的印迹位点

分子印迹聚合物(MIPs)是对特定(模板)分子具有选择性识别功能的合成受体^[1~6]. 它们不仅具有与天然生物受体(如抗体与酶)可相比拟的亲性和选择性, 还具有稳定性高、制备容易、成本低等优点, 因此在与分子识别相关的分离纯化^[1,4,5]、仿酶催化^[3]、免疫分析^[4]、化学传感^[4]、药物开发^[1]、药物传输^[5]、生物成像^[6]、纳米药物^[2]等领域展现出巨大的应用前景, 成为目前人们研究的热点.

MIPs的制备过程通常包括模板分子与功能单体通过自组装形成单体-模板复合物. 该复合物与交联单体共聚合, 将模板分子从交联聚合物网络中去除3个步骤. 所形成的MIPs中的印迹位点由于交联体系的固定作用而与模板分子的形状、体积及功能基团位置相匹配, 因此可对模板分子具有优异的亲性和选择性. 目前, 以有机小分子为模板的MIPs的制备技术已经相当

成熟, 且该类MIPs已经在固相萃取领域获得商业化应用. 相比之下, 如何有效制备对生物大分子(如蛋白)具有优异识别性能的MIPs仍然是具有挑战性的课题^[7~9]. 这主要是由于生物大分子模板通常具有体积大、表面结构复杂、构象柔顺、稳定性低等特点. 迄今为止已发展的制备以生物大分子为模板的MIPs的技术主要包括本体聚合法、抗原决定基印迹法及表面印迹法^[7~9]. 其中表面印迹法由于所得到的印迹位点均在MIPs表面上, 从而可以更容易地将大分子模板除去且保证其较快的吸附动力学, 因此成为目前最常用的制备生物大分子MIPs的方法.

如上所述, MIPs的制备过程通常需要交联步骤以固定其印迹位点的形状、体积及功能基团的位置, 从而达到对模板有效识别的目的^[1~6]. 目前人们制备的以生物大分子为模板的MIPs通常均为交联体系, 而具有

引用格式: 黄丽洁, 郑从光, 张会旗. 表面具有非交联结构糖蛋白识别位点的分子印迹聚合物微球的可控制备. 科学通报, 2019, 64: 1407–1417

Huang L J, Zheng C G, Zhang H Q. Controlled preparation of molecularly imprinted polymer microspheres with surface uncrosslinked glycoprotein binding cavities (in Chinese). Chin Sci Bull, 2019, 64: 1407–1417, doi: [10.1360/N972018-01000](https://doi.org/10.1360/N972018-01000)

非交联印迹位点的MIPs的报道则非常有限^[10-12]. 最近, 一些研究组报道了通过在模板蛋白周围形成非交联的自组装单层膜来制备可选择性识别该蛋白的MIPs, 其中由自组装单层膜围成的与模板蛋白形状与体积相匹配的非交联空穴对于所得MIPs的蛋白识别性能起着至关重要的作用^[10-12]. 与交联结构印迹位点相比, 非交联结构印迹位点应该具有更利于去除大分子模板的优点, 因此发展制备具有非交联结构的生物大分子识别迹位点, 且对其具有优异识别性能MIPs的简便高效的方法具有重要意义.

糖蛋白占哺乳动物中所含总蛋白的50%以上, 它们在分子识别、细胞内或细胞间的信号传递、免疫反应等生物过程中起着决定性作用, 同时许多糖蛋白还是疾病生物指针与治疗目标物, 因此发展高性能的糖蛋白MIPs识别材料成为目前分子印迹领域重要的研究内容^[9].

本文将本课题组发展的可控“活性”自由基沉淀聚合技术^[13]与表面锚定策略^[14]及表面引发的可控自由基聚合方法^[15]相结合, 发展了一种可控制备表面具有非交联结构糖蛋白(卵清蛋白(OVA))识别位点的MIP微球的简便高效的新方法(图1). 首先利用原子转移自由基沉淀聚合(ATRPP)一步法制备了表面同时含环氧基与卤代烷基且粒径均匀的“活性”聚合物微球, 然后通过化学修饰在其表面引入苯硼酸基团并以其锚定OVA, 进一步以所得表面锚定有OVA的“活性”聚合物微球上的卤代烷基引发亲水性单体 N -异丙基丙烯酰胺的可控

表面原子转移自由基聚合(ATRP)以在OVA周围接枝亲水性聚合物刷, 最后通过去除糖蛋白模板后得到表面具有未交联结构OVA印迹位点的MIP微球. 对所得MIP微球的形貌、化学结构、表面亲水性、水相分散稳定性及其对OVA的吸附性能进行了系统研究. 结果表明, 所得MIPs对OVA具有优异的识别性能, 且MIPs表面亲水性聚合物刷壳层厚度对其对糖蛋白吸附性能有着显著的影响. 此工作将可控聚合技术与表面蛋白锚定技术相结合, 为高效可控地制备高性能的蛋白印迹MIPs开辟了新途径. 相关研究未见文献报道.

1 实验

(i) 试剂及仪器. 2-氯丙酸乙酯(97%, 阿尔法试剂公司)、五甲基二乙基三胺(PMDETA, 97%, 阿尔法试剂公司)、无水氯化铜(CuCl_2 , 98%, 阿尔法试剂公司)、间氨基苯硼酸(APBA, 98%, 天津希恩思生化科技有限公司)、无水乙醇(分析纯)、甲醇(分析纯)、磷酸二氢钠(99%)、磷酸氢二钠(99%)、乙酸钠(分析纯)、冰乙酸(分析纯)、中性氧化铝(100~200目)均购自天津江天化工技术有限公司. 卵清蛋白(OVA, $\text{pI}=4.7$, $M_w=45.0$ kDa)、牛血清蛋白(BSA, $\text{pI}=4.8$, $M_w=66.0$ kDa)、溶菌酶(Lyz, $\text{pI}=11.3$, $M_w=14.3$ kDa)购自北京索莱宝生物科技有限公司. 甲基丙烯酸缩水甘油酯(GMA, 化学纯, 天津希恩思生化科技有限公司)、二甲基丙烯酸乙二醇酯(EGDMA, 98%, 阿尔法试剂公司)及氯化亚铜(CuCl , 分析纯, 天津江天化工技术有限公司)使用前均按照文

图1 (网络版彩色)表面具有非交联结构糖蛋白识别位点的分子印迹聚合物微球的可控制备过程示意图

Figure 1 (Color online) Schematic protocol for the controlled synthesis of MIP microspheres with uncrosslinked surface glycoprotein recognition sites.

献[16]的方法纯化。N-异丙基丙烯酰胺(NIPAAm, 99%, ACROS)采用丙酮重结晶后使用。

傅里叶变换红外光谱仪(FT-IR, Magna-560, 美国 Nicolet公司); 金相显微镜(北京泰克仪器有限公司); 扫描电子显微镜(SEM, 日本岛津SS-550)(表面含环氧基的“活性”聚合物微球的粒径及其粒径分布由其SEM图参照文献[16]的方法计算得到); 凝胶渗透色谱(GPC, 美国安捷伦公司); 1200 HPLC泵、示差检测器、Waters Ultrastaygel柱子(分子量范围: 5~600 K, 500~30 K, 100~10 K); 流动相: 四氢呋喃; 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 35℃; 聚苯乙烯标样); 接触角测量仪(德国KRÜSS FM40 Easy Drop); TU-1900双光束紫外可见分光光度计(UV-vis, 北京普析通用仪器有限公司); 高低温恒温振荡培养箱(HZQ-F160A, 上海一恒科学仪器有限公司)。

(ii) 表面含环氧基(与卤代烷基)的“活性”poly(GMA-co-EGDMA)微球的制备。参照文献[16]方法合成。

(iii) 表面含苯硼酸基(与卤代烷基)的“活性”聚合物微球的制备。首先将APBA(10 mg)溶于乙醇(4 mL)中, 然后将表面含环氧基的“活性”poly(GMA-co-EGDMA)微球(50 mg)加入上述溶液中, 将上述体系在冰水浴中通氩气10 min后置于60℃油浴中反应24 h。用乙醇多次洗涤产物, 于40℃下真空干燥至恒重。利用UV-vis测定反应前后体系中APBA的含量, 得到修饰后的聚合物微球表面上的苯硼酸基团的含量为12 mg/g(即88 nmol/mg)。

(iv) 表面具有非交联结构OVA印迹位点的MIP微球的制备。自组装: 首先将表面含苯硼酸基团的“活性”聚合物微球(50 mg, 含4.40 μmol苯硼酸基团)、OVA(80 mg, 1.78 μmol)和15 mL磷酸缓冲溶液(PBS, 0.02 mol/L, pH 9)加入圆底烧瓶(25 mL)中, 在25℃下自组装2 h后离心, 并用水洗得到表面锚定有OVA的“活性”聚合物微球。该阶段不加入OVA进行上述反应得到表面未锚定OVA的“活性”聚合物微球。

表面可控聚合: 将NIPAAm(135.5 mg, 1.197 mmol), CuCl₂(0.13 mg, 0.001 mmol)、纯水(5 mL)与上述所得表面锚定有OVA的“活性”聚合物微球(50 mg)依次加入鸡心瓶(25 mL)中, 通氩气除氧15 min后加入CuCl(1.0 mg, 0.01 mmol); 再通氩气15 min加入配体PMDETA(3.52 mg, 0.0203 mmol), 继续通氩气15 min后加入ATRP(牺牲)引发剂2-氯丙酸乙酯(0.43 mg, 3.165 μmol),

继续通氩气15 min后将反应瓶封口置于25℃的水浴中反应不同时间($t=3, 6, 9, 12$ h)。反应结束后用水多次洗涤产物, 然后离心并收集上清液。将所得上清液过中性氧化铝柱除去铜盐(以四氢呋喃为淋洗液), 然后在正己烷中沉降得到反应体系中产生的自由poly(NIPAAm)(即PNIPAAm)。

模板洗脱: 用乙酸钠/乙酸(0.05 mmol/L, pH 4)水溶液洗脱模板(洗脱过程中利用UV-vis分析洗脱液, 直到其中无OVA为止), 然后分别用水和甲醇洗涤, 最后在25℃条件下真空干燥至恒重, 得到印迹聚合物MIPs(MIP-PNIPAAm- t ($t=3, 6, 9, 12$ h))。

在同样条件下, 但仅使用表面没有锚定OVA的“活性”聚合物微球进行上述反应, 制备非印迹(或参比)聚合物CPs(CP-PNIPAAm- t ($t=3, 6, 9, 12$ h))。

(v) 静态水接触角测试。将表面未接枝亲水性聚合物刷的“活性”poly(GMA-co-EGDMA)微球与MIPs/CPs微球超声分散在DMF中(聚合物浓度为10 mg/mL), 然后将其滴在干净的玻璃片上, 室温下使DMF挥发, 进一步真空干燥后用接触角测量仪测试其静态水接触角。

(vi) 水相分散稳定性测试。将表面未接枝亲水性聚合物刷的“活性”poly(GMA-co-EGDMA)微球与MIPs/CPs微球分别加入纯水中(1 mg/mL), 置于超声波水浴中超声30 min后将其在25℃下静置, 观察各聚合物微球在水中的沉降行为。

(vii) MIP/CP的吸附动力学测试。首先将OVA溶解于PBS溶液(0.02 mol/L, pH 9.0, 含0.5 mol/L NaCl)中得到1 mg/mL的OVA溶液, 将其依次稀释成浓度为0.75, 0.5, 0.25及0.125 mg/mL的溶液, 利用UV-vis测定各溶液在279 nm处的紫外吸收值, 得到OVA溶液的标准曲线。

配制一系列MIP-PNIPAAm-6 h/CP-PNIPAAm-6 h与OVA的PBS溶液(0.02 mol/L, pH 9.0, 含0.5 mol/L NaCl)的混合液(1 mg/mL), 在25℃下摇动不同时间后离心移取上清液, 用UV-vis测定其在279 nm处的紫外吸收值。通过与OVA溶液标准曲线比较, 即可得到溶液中OVA的浓度。

根据吸附前后溶液中OVA浓度的变化, 并利用下列方程即可得到不同吸附时间聚合物对OVA的吸附量 B (mg/g):

$$B = (C_0 - C_f) \times V / m,$$

式中, C_0 表示蛋白质的起始浓度(mg/mL), C_f 表示吸附

后清液中蛋白质的浓度(mg/mL), m 表示用于蛋白吸附的聚合物的质量(g), V 表示所取蛋白质溶液的体积(mL).

(viii) 聚合物平衡吸附性能测试. 称取表面含苯硼酸基团的“活性”聚合物微球或MIPs/CPs微球3 mg, 加入3 mL OVA的PBS溶液(0.02 mol/L, pH 9.0, 含0.5 mol/L NaCl) (0.5 mg/mL)中, 置于恒温摇床在25℃摇动6 h后离心移取上清液1.0 mL, 利用UV-vis测定其在279 nm处的紫外吸收值. 利用与吸附动力学测试中相同的方法即可得到各聚合物对OVA的吸附量 B (mg/g).

(ix) MIP/CP的选择性研究. 将MIP-PNIPAAm-6 h或CP-PNIPAAm-6 h微球(3 mg)加入相同浓度(0.5 mg/mL)不同蛋白(OVA, BSA, Lyz)的PBS (0.02 mol/L, pH 9.0, 含0.5 mol/L NaCl)溶液(3 mL)中, 置于恒温摇床在25℃摇动6 h后离心移取上清液1.0 mL, 利用UV-vis测定其在279 nm处的紫外吸收值, 即可按吸附动力学测试中的方法得到MIP/CP对不同蛋白质的吸附量 B (mg/g).

2 结果与讨论

2.1 表面具有非交联结构糖蛋白识别位点的MIP微球的制备

首先参考文献[16]的方法, 利用ATRP一步法合成了表面同时含环氧基与卤代烷基的“活性”poly(GMA-co-EGDMA)微球. 光学显微镜观察发现其为均匀的微

球(图S1(a)), 利用SEM表征(图S2)测得其直径($D_{n,SEM}$)为0.817 μm (表1, 实验1), 粒径分布指数为1.028. 将其表面的环氧基与APBA的氨基反应以引入表面苯硼酸基团并利用其表面锚定OVA, 进一步以表面锚定有OVA的“活性”聚合物微球(图S1(b))为固载化引发剂进行NIPAAm的表面可控ATRP. 通过改变聚合反应时间, 得到一系列表面具有不同长度亲水性聚合物刷的聚合物微球. 将OVA洗脱后, 便得到相应的表面含非交联结构糖蛋白识别位点的MIP微球. 实验结果表明: 经过表面接枝聚合反应得到的聚合物微球均比反应前有一定的增重, 且增重量随接枝聚合反应时间的延长而增加(表1, 实验2~9), 说明PNIPAAm刷已成功接枝到了聚合物微球的表面上, 且其分子量随着接枝聚合时间的增加而增大. 光学显微镜表征发现, 所得MIPs/CPs均为分散性良好且粒径均匀的聚合物微球(图S1(c)~(j)).

利用FT-IR对所得代表性聚合物进行了表征. 由图2可见, 与“活性”poly(GMA-co-EGDMA)微球相比, 表面修饰有苯硼酸基团的聚合物微球在1360 cm^{-1} 处出现了B-O伸缩振动峰, 而表面接枝PNIPAAm刷的聚合物微球在1681与1537 cm^{-1} 处分别出现了酰胺I键(C=O)与酰胺II键(N-H)的伸缩振动峰. 上述结果说明聚合物微球表面修饰与接枝聚合反应均已成功.

大量研究结果表明, 在聚合物微球表面接枝亲水性聚合物刷后可以明显提高其表面亲水性及其水相分散稳定性^[17~19]. 利用接触角测量仪测定了“活性”poly(GMA-co-EGDMA)微球及MIP-PNIPAAm- t /CP-PNIPAAm- t 微球所形成薄膜的表面亲水性能(表1). 研究结

表1 “活性”poly(GMA-co-EGDMA)微球与MIPs/CPs微球的合成与表征数据

Table 1 Synthesis and characterization data of “living” poly(GMA-co-EGDMA) microspheres and MIP/CP microspheres

实验编号	聚合物微球	增重 $\Delta W(\%)$	$D_{n,SEM}(\mu\text{m})^a)$	$M_{n,NMR}^b)$	$L_{max}(\text{nm})^c)$	$\beta(\text{根}/\text{nm}^2)^d)$	静态水接触角($^\circ$)
1	Poly(GMA-co-EGDMA)	—	0.817	—	—	—	114.2
2	MIP-PNIPAAm-3 h	2.6	—	2850	6.33	0.75	75.1
3	CP-PNIPAAm-3 h	2.7	—	3000	6.67	0.74	74.8
4	MIP-PNIPAAm-6 h	5.0	—	4400	9.78	0.93	70.3
5	CP-PNIPAAm-6 h	5.2	—	4450	9.89	0.96	70.2
6	MIP-PNIPAAm-9 h	5.8	—	5200	11.56	0.91	69.0
7	CP-PNIPAAm-9 h	6.1	—	5300	11.78	0.94	68.8
8	MIP-PNIPAAm-12 h	7.1	—	6050	13.44	0.96	68.0
9	CP-PNIPAAm-12 h	7.3	—	6150	13.67	0.97	67.9

a) 利用SEM所得微球数均直径; b) 聚合物微球表面接枝PNIPAAm刷时, 因体系中加入牺牲引发剂得到的自由聚合物由核磁共振分析所得分子量; c) 聚合物刷平面锯齿形伸直链长度; d) 聚合物刷接枝密度

图 2 代表性聚合物微球的FT-IR谱图. (a) 表面含环氧基的“活性”聚合物微球; (b) 表面含苯硼酸基的“活性”聚合物微球; (c) MIP-PNIPAAm-6 h

Figure 2 FT-IR spectra of some representative polymer microspheres. (a) “Living” polymer microspheres with surface epoxy groups; (b) “Living” polymer microspheres with surface phenylboronic acid groups; (c) MIP-PNIPAAm-6 h

果表明, 聚合物微球表面接枝PNIPAAm刷后, 其表面亲水性比未接枝的微球有明显增加; 且随着接枝聚合时间的延长, 所得MIPs与CPs的表面亲水性逐渐增大. 图3(a)给出了代表性的聚合物微球所形成薄膜的静态水接触角测定结果. 此外, 还研究了“活性”poly(GMA-co-EGDMA)微球及代表性的MIP-PNIPAAm-6 h/CP-PNIPAAm-6 h微球在纯水中的分散稳定性(图3(b)). 可以看出, 当聚合物微球表面接枝上PNIPAAm刷后其水相分散稳定性较未接枝的微球有了明显的提高.

上述红外、接触角及水相分散稳定性实验结果证明, 我们已经利用表面引发的可控ATRP成功获得了表面接枝有PNIPAAm刷的聚合物微球. 下面我们对聚合物微球表面接枝的PNIPAAm刷进行了定量分析, 以期获得其分子量、聚合物刷壳层厚度及其接枝密度的相关信息.

通常认为, 在以“活性”聚合物微球为固载化引发剂进行的表面引发的ATRP体系中, 由于加入牺牲引发剂得到的自由聚合物的分子量与接枝到聚合物微球上的聚合物刷的分子量相等^[20]. 为了获得接枝到MIPs/CPs微球表面的PNIPAAm刷的分子量信息, 我们在表面引发的ATRP体系中加入了适量的牺牲引发剂(2-氯丙酸乙酯)并得到了自由的PNIPAAm. 图4(a)与(b)分别给出了制备MIP-PNIPAAm-*t*与CP-PNIPAAm-*t*时体系中产生的自由PNIPAAm的¹H NMR谱图.

首先利用¹H NMR结果与下列方程得到了各接枝

图 3 (网络版彩色)聚合物微球表面亲水性测试结果. (a) 水滴在“活性”poly(GMA-co-EGDMA)(a1), MIP-PNIPAAm-6 h(a2)与CP-PNIPAAm-6 h(a3)微球所形成的薄膜上的形态图; (b) “活性”poly(GMA-co-EGDMA)(b1), MIP-PNIPAAm-6 h(b2)与CP-PNIPAAm-6 h(b3)微球在纯水中的分散图(超声分散后于25℃下静置4 h)

Figure 3 (Color online) Experimental results of the surface hydrophilicity of polymer microspheres. (a) Profiles of a water drop on the films of “living” poly(GMA-co-EGDMA) (a1), MIP-PNIPAAm-6 h (a2), and CP-PNIPAAm-6 h (a3) microspheres; (b) photographs showing the dispersion of “living” poly(GMA-co-EGDMA) (b1), MIP-PNIPAAm-6 h (b2), and CP-PNIPAAm-6 h (b3) microspheres in pure water (standing for 4 h at 25°C after ultrasonication dispersion)

聚合体系中所得到自由聚合物的分子量(表1).

$$M_{n,NMR(PNIPAAm)} = 2 \times \left(\frac{S_a}{S_h} \right) \times M_{NIPAAm} + M_{2-氯丙酸乙酯},$$

其中, S_a 与 S_h 分别代表 δ 4.01处的 a 峰与 δ 4.21处的 h 峰的积分, $M_{n,NMR(PNIPAAm)}$, M_{NIPAAm} 与 $M_{2-氯丙酸乙酯}$ 分别代表PNIPAAm, NIPAAm与2-氯丙酸乙酯的分子量.

实验结果表明, 当接枝聚合时间为3~12 h时, 接枝到MIPs与CPs表面的PNIPAAm刷的数均分子量分别为2850~6050与3000~6150. 随着接枝聚合反应时间的延长, 表面接枝的PNIPAAm刷的分子量成线性增加(图5). 此外, 还利用GPC对接枝时间为6 h时得到的代表性的自由PNIPAAm的分子量($M_{n,GPC}$)及其分子量分布(D)进行了测定. 结果发现, 接枝到MIP-PNIPAAm-6 h与CP-PNIPAAm-6 h上的PNIPAAm刷的 $M_{n,GPC}$ 分别为6000与6200 g/mol(数均相对分子量), 其 D 值分别为1.18与1.24. 上述结果说明表面接枝PNIPAAm刷的聚合过程可控性良好.

通过假定PNIPAAm刷在所得MIPs与CPs微球表面

图4 制备MIP-PNIPAAm-*t*(a)与CP-PNIPAAm-*t*(b)时体系中产生的自由PNIPAAm的¹H NMR谱图. 接枝时间 $t=3$ h(a1, b1), 6 h(a2, b2), 9 h(a3, b3), 12 h(a4, b4). 溶剂为CDCl₃

Figure 4 ¹H NMR spectra of the free PNIPAAm obtained from the surface-initiated ATRP systems during the preparation of MIP-PNIPAAm-*t* (a) and CP-PNIPAAm-*t* (b). $t=3$ h (a1, b1), 6 h (a2, b2), 9 h (a3, b3), 12 h (a4, b4). Solvent: CDCl₃

图5 MIPs/CPs表面上所接枝的PNIPAAm刷的分子量与接枝时间的关系图

Figure 5 Dependence of molecular weights of the grafted PNIPAAm brushes on the grafting time

均匀分布(除MIPs上印迹位点处除外), 且聚合物微球的密度 $\rho=1$ g/mL. PNIPAAm刷在MIPs与CPs微球表面上的平均接枝密度 β (根聚合物刷/nm²)可通过下列方程来计算^[21].

$$\Delta W(\%) = \left[\left(S \times \beta \times M_{n,NMR(PNIPAAm)} \right) / (N_A \times V \times \rho) \right] \times 100\%,$$

其中, ΔW 代表通过接枝聚合反应在MIPs与CPs微球表面接枝上PNIPAAm导致的聚合物微球相对于“活性”poly(GMA-co-EGDMA)微球的增重百分数, S 代表每个“活性”poly(GMA-co-EGDMA)微球的平均表面积 $[S=4\pi(D_n/2)^2]$, $M_{n,NMR(PNIPAAm)}$ 代表由核磁测定的PNIPAAm刷的绝对分子量, N_A 代表阿伏伽德罗常数, V 代表每个“活性”poly(GMA-co-EGDMA)微球的平均体积 $[V=(4/3)\pi(D_n/2)^3]$.

PAAm刷的绝对分子量, N_A 代表阿伏伽德罗常数, V 代表每个“活性”poly(GMA-co-EGDMA)微球的平均体积 $[V=(4/3)\pi(D_n/2)^3]$.

表1列出了所得MIPs与CPs微球表面上接枝的PNIPAAm刷的平均接枝密度. 可见在所有情况下PNIPAAm刷的接枝密度均 ≥ 0.74 根/nm², 说明MIPs与CPs微球表面均成功接枝上了很密的PNIPAAm刷^[22]. 这也说明MIPs/CPs表面上的PNIPAAm刷在室温下的水溶液中应该处于伸展状态.

进一步利用下列公式计算得到了MIPs/CPs表面上接枝的PNIPAAm刷的平面锯齿形伸直链长度 L_{max} (表1)^[23]:

$$L_{max} = 2 \times DP \times l \times \cos(a/2) = 2 \times DP \times l \times (2/3)^{1/2},$$

其中DP代表PNIPAAm的聚合度(C-C单键的数目=2×DP), l 代表C-C单键的键长($l=0.154$ nm), a 代表两个C-C单键夹角的补角, 即 $=180^\circ-109.5^\circ$.

应该指出的是, MIPs/CPs表面上接枝的PNIPAAm刷在水溶液中的实际伸展长度由于高分子链的柔顺性应该(略)小于 L_{max} .

2.2 表面具有非交联结构糖蛋白识别位点的MIPs及其参比聚合物CPs的吸附性能研究

首先研究了代表性的MIP-PNIPAAm-6 h与CP-PNIPAAm-6 h对OVA在PBS溶液中的吸附动力学. 由图6可见, MIP-PNIPAAm-6 h对OVA的吸附容量随吸附时间的延长而逐渐增加, 在吸附时间为90 min时其模板吸

图 6 MIP-PNIPAAm-6 h/CP-PNIPAAm-6 h在OVA的PBS溶液(0.5 mg/mL)中的吸附动力学图(聚合物浓度: 1 mg/mL)
Figure 6 Binding kinetics of MIP-PNIPAAm-6 h/CP-PNIPAAm-6 h toward OVA in PBS solution (0.5 mg/mL). Polymer concentration: 1 mg/mL

附量基本达到饱和,说明此MIP微球具有较快的蛋白吸附动力学。同时还可以看出, MIP-PNIPAAm-6 h对OVA的吸附量大于CP-PNIPAAm-6 h对OVA的吸附量。上述结果说明,在所得MIP微球表面确实形成了由高接枝密度的PNIPAAm刷围成的与OVA形状与体积相匹配且对OVA具有识别能力的印迹空穴,这与前人通过在模板蛋白周围形成非交联的自组装单层膜来制备对该蛋白有识别能力的MIPs相似^[10-12]。应该指出的是,在MIP吸附模板蛋白的过程中, OVA可进入到MIP-PNIPAAm-6 h微球表面由亲水性PNIPAAm刷所形成的未交联的印迹空穴中,并与微球表面的苯硼酸基团发生作用而被吸附,同时还能与印迹空穴周围的PNI-

PAAm刷上的各种功能基团发生多重相互作用而实现吸附。而对于CP-PNIPAAm-6 h,由于其表面不存在印迹空穴,而仅有高分子刷产生的非专一性吸附,因此其对OVA的吸附量要远远小于印迹聚合物的吸附量。以上结果充分证明我们已成功地在聚合物微球表面形成了对模板蛋白具有优异识别性能的未交联结构的糖蛋白印迹位点。

进一步研究了通过不同接枝时间得到的MIP-PNIPAAm-*t*/CP-PNIPAAm-*t*对OVA的平衡吸附性能(图7)。由图7(a)可见,不同接枝时间所得MIPs对OVA的平衡吸附量均高于其相应的CPs,这进一步证明了表面印迹的成功。同时随着接枝时间的延长, MIPs对OVA在PBS溶液中的平衡吸附量发生先迅速增加再明显减小的现象,而CPs对OVA的平衡吸附量则缓慢降低。前者主要是由于MIPs表面的印迹空穴对OVA的作用力与其表面的PNIPAAm刷对OVA接近印迹位点会产生位阻这两个因素综合作用的结果。如前所述, OVA与MIPs上印迹位点的相互作用主要包括两部分,即OVA与印迹位点中硼酸基团间的键合作用及其与印迹位点周围高分子刷的多重非共价相互作用。当接枝时间较短($t < 6$ h)时, MIPs上接枝的PNIPAAm刷较短(小于OVA粒径(6 nm^[24])与表面修饰的苯硼酸基团的长度之和(共约7 nm)),致使OVA与亲水性刷的多重相互作用较弱而导致MIPs对OVA吸附量较低。而当接枝时间过长时($t > 6$ h), MIPs上所接枝的PNIPAAm刷过长,从而对OVA进入印迹空穴会产生阻碍作用而导致其OVA吸附量降低。只有当接枝时间适中时($t = 6$ h), MIPs上所接枝的PNI-

图 7 MIPs/CPs对OVA的平衡吸附性能图。(a) MIP-PNIPAAm-*t*(实心三角)/CP-PNIPAAm-*t*(空心三角)微球在OVA的PBS溶液(0.5 mg/mL)中对OVA的平衡吸附量与接枝时间的关系图; (b) MIP-PNIPAAm-*t*微球在OVA的PBS溶液(0.5 mg/mL)中对OVA的专一性吸附与接枝时间的关系图(MIPs/CPs浓度: 1 mg/mL)
Figure 7 Experimental results for the equilibrium bindings of MIPs/CPs toward OVA. (a) Dependence of equilibrium bindings of MIP-PNIPAAm-*t* (filled triangle)/CP-PNIPAAm-*t* (open triangle) toward OVA in its PBS solution (0.5 mg/mL) on the grafting time; (b) dependence of specific bindings of MIP-PNIPAAm-*t* toward OVA in its PBS solution on the grafting time (the concentration of MIPs/CPs: 1 mg/mL)

PAAm刷的长度刚好与OVA的尺度和表面修饰的苯硼酸基团的长度之和(共约7 nm)相匹配, 因此会产生最大的OVA平衡吸附性能. 而CPs对OVA的平衡吸附量随着接枝时间的延长缓慢降低则是由于随着亲水性聚合物刷长度的增加, 其抗蛋白吸附能力增强导致的^[17,18]. 相应地, 在通过不同接枝时间得到的MIPs中, MIP-PNIPAAm-6 h也表现出了最优的印迹因子(IF=MIP对OVA的吸附量除以CP对OVA的吸附量=1.7).

上述解释还可进一步说明图7(a)中所得到的表面仅修饰了APBA的聚合物微球(接枝时间为0 h)与各MIPs对OVA吸附结果的差异. 当MIPs表面接枝的PNIPAAm刷不太长时(即MIP-PNIPAAm-*t*, *t* = 3, 6, 9 h), 印迹位点对OVA的作用力因素占主导地位, 因此这些MIPs对OVA的吸附量要高于表面仅修饰了APBA的聚合物微球对OVA的吸附量; 而当MIPs表面所接枝的PNIPAAm刷过长时(即MIP-PNIPAAm-12 h), 位阻因素占主导地位, 因此会使MIPs对OVA的吸附量反而比表面仅修饰了APBA的聚合物微球对OVA的吸附量要低.

图7(b)结果表明, MIP-PNIPAAm-6 h对OVA的专一性吸附(即MIP对模板的吸附量减去CP对模板的非专一性吸附量)亦在接枝时间为6 h时出现最大值, 这也与上述解释相符.

最后还研究了MIP-PNIPAAm-6 h与CP-PNIPAAm-6 h对OVA(*pI*=4.7, *M_w*=45.0 kDa)的选择性吸附性能. 选用不同结构和分子量的另外两种蛋白质(即BSA(*pI*=4.8, *M_w*=66.0 kDa)与Lyz(*pI*=11.3, *M_w*=14.3 kDa)作为参比物, 通过比较MIP-PNIPAAm-6 h/CP-PNIPAAm-6 h对OVA及其他蛋白的吸附能力来分析其对模板分子的选择性能. 由图8可以看出, MIP-PNIPAAm-6 h对OVA的吸附能力要远远高于其他两种蛋白, 亦大大高

图8 MIP-PNIPAAm-6 h/CP-PNIPAAm-6 h在OVA, BSA与Lyz的PBS溶液(各蛋白浓度均为0.5 mg/mL)中对各蛋白的吸附性能(聚合物浓度: 1 mg/mL)

Figure 8 Equilibrium bindings of MIP-PNIPAAm-6 h/CP-PNIPAAm-6 h toward different proteins in their PBS solution (C_{OVA} or BSA or Lyz = 0.5 mg/mL). Polymer concentration: 1 mg/mL

于其参比聚合物CP-PNIPAAm-6 h对OVA的吸附量; 且MIP-PNIPAAm-6 h与CP-PNIPAAm-6 h对BSA与Lyz的吸附容量基本相同, 这些均说明MIP表面未交联的印迹位点对模板蛋白具有良好的选择性. 图S3与表S1中所列结果也进一步证明了这一点.

与前人已经报道的通过不同制备技术得到的具有交联结构OVA印迹位点的MIPs相比(表2)^[25-28], 本工作所得表面具有非交联结构OVA识别位点的MIP-PNIPAAm-6 h微球虽然印迹因子(IF)略低, 但是却具有显著增高的模板吸附容量与专一性吸附. 其略低的印迹因子应该与所得CP微球上PNIPAAm刷对OVA较高的非专一性吸附有关. 通过优化MIP/CP微球表面上接枝的亲水性聚合物刷的种类应该可以达到降低其对糖蛋白非专一性吸附进而提高其印迹因子的目的, 相关工作

表2 本工作所得MIP-PNIPAAm-6 h的吸附性能与已有的印迹OVA的其他文献比较

Table 2 Comparison of the binding properties of MIP-PNIPAAm-6 h prepared in this work with those of the previously reported OVA-imprinted polymers

编号	OVA-MIP的合成方法 ^{a)}	印迹位点	印迹因子(IF) ^{b)}	MIP的吸附容量(mg/g)	MIP的专一性吸附(mg/g) ^{d)}	文献
1	本体聚合	交联	3.4	21	15	[25]
2	表面印迹	交联	4.5	6.03	4.7	[26]
3	表面印迹	交联	~1.8 ^{c)}	81.2	38	[27]
4	表面印迹	交联	~3.9 ^{c)}	51.18	38	[28]
5	可控表面接枝(6 h)	非交联	1.7	206	84	本工作

a) 表中所列工作均使用苯硼酸单体与OVA发生作用; b) IF等于MIP对模板的吸附量除以CP对模板的吸附量; c) 所列IF是我们依据论文中的实验数据计算得到的; d) MIP的专一性吸附等于其对模板的吸附量减去CP对模板的吸附量

正在进行中。

3 结论

本文将可控/“活性”自由基沉淀聚合技术、表面锚定模板策略及表面引发的可控自由基聚合方法相结合,通过简便高效地合成表面锚定有糖蛋白的“活性”聚合物微球并在其表面可控地接枝亲水性PNIPAAm刷的方法,成功制备了一系列表面具有非交联结构糖蛋白识

别位点的MIP微球,它们均对模板糖蛋白OVA表现出专一性吸附性能。同时亲水性高分子刷的长度对所得MIPs对模板糖蛋白的吸附性能有重要影响。只有当其长度与模板糖蛋白的粒径相匹配时才能获得识别性能最优的MIPs。此工作为发展具有优异的生物大分子识别性能的表面印迹聚合物微球开辟了简便高效的新途径,所得糖蛋白印迹聚合物在生物样品分离与分析等领域具有广阔的应用前景。

参考文献

- 1 Zhang H, Ye L, Mosbach K. Non-covalent molecular imprinting with emphasis on its application in separation and drug development. *J Mol Recognit*, 2006, 19: 248–259
- 2 Hoshino Y, Shea K J. The evolution of plastic antibodies. *J Mater Chem*, 2011, 21: 3517–3521
- 3 Wulff G, Liu J. Design of biomimetic catalysts by molecular imprinting in synthetic polymers: The role of transition state stabilization. *Acc Chem Res*, 2012, 45: 239–247
- 4 Chen L, Wang X, Lu W, et al. Molecular imprinting: Perspectives and applications. *Chem Soc Rev*, 2016, 45: 2137–2211
- 5 Wackerlig J, Schirhagl R. Applications of molecularly imprinted polymer nanoparticles and their advances toward industrial use: A review. *Anal Chem*, 2016, 88: 250–261
- 6 Pan J, Chen W, Ma Y, et al. Molecularly imprinted polymers as receptor mimics for selective cell recognition. *Chem Soc Rev*, 2018, 47: 5574–5587
- 7 Li S, Cao S, Whitcombe M J, et al. Size matters: Challenges in imprinting macromolecules. *Prog Polym Sci*, 2014, 39: 145–163
- 8 Zhang H. Recent advances in macromolecularly imprinted polymers by controlled radical polymerization techniques. *Mol Imprint*, 2015, 3: 35–46
- 9 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
- 10 Wang Y, Zhou Y, Sokolov J, et al. A potentiometric protein sensor built with surface molecular imprinting method. *Biosens Bioelectron*, 2008, 24: 162–166
- 11 Zhang X, Du X, Huang X, et al. Creating protein-imprinted self-assembled monolayers with multiple binding sites and biocompatible imprinted cavities. *J Am Chem Soc*, 2013, 135: 9248–9251
- 12 Stephenson-Brown A, Acton A L, Preece J A, et al. Selective glycoprotein detection through covalent templating and allosteric click-imprinting. *Chem Sci*, 2015, 6: 5114–5119
- 13 Zhang H. Controlled/“living” radical precipitation polymerization: A versatile polymerization technique for advanced functional polymers. *Eur Polym J*, 2013, 49: 579–600
- 14 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
- 15 Zoppe J O, Ataman N C, Mocny P, et al. Surface-initiated controlled radical polymerization: State-of-the-art, opportunities, and challenges in surface and interface engineering with polymer brushes. *Chem Rev*, 2017, 117: 1105–1318
- 16 Zhang H, Jiang J, Zhang H, et al. Efficient synthesis of molecularly imprinted polymers with enzyme inhibition potency by the controlled surface imprinting approach. *ACS Macro Lett*, 2013, 2: 566–570
- 17 Ma Y, Pan G, Zhang Y, et al. Narrowly dispersed hydrophilic molecularly imprinted polymer nanoparticles for efficient molecular recognition in real aqueous samples including river water, milk, and bovine serum. *Angew Chem Int Ed*, 2013, 52: 1511–1514
- 18 Zhao M, Chen X, Zhang H, et al. Well-defined hydrophilic molecularly imprinted polymer microspheres for efficient molecular recognition in real biological samples by facile RAFT coupling chemistry. *Biomacromolecules*, 2014, 15: 1663–1675
- 19 Li C, Ma Y, Niu H, et al. Hydrophilic hollow molecularly imprinted polymer microparticles with photo- and thermoresponsive template binding and release properties in aqueous media. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2015, 7: 27340–27350
- 20 Gorman C B, Petrie R J, Genzer J. Effect of substrate geometry on polymer molecular weight and polydispersity during surface-initiated polymerization. *Macromolecules*, 2008, 41: 4856–4865
- 21 Pan G, Zhang Y, Guo X, et al. An efficient approach to obtaining water-compatible and stimuli-responsive molecularly imprinted polymers by the facile surface-grafting of functional polymer brushes via RAFT polymerization. *Biosens Bioelectron*, 2010, 26: 976–982

- 22 Wu T, Zhang Y, Wang X, et al. Fabrication of hybrid silica nanoparticles densely grafted with thermoresponsive poly(*N*-isopropylacrylamide) brushes of controlled thickness via surface-initiated atom transfer radical polymerization. *Chem Mater*, 2008, 20: 101–109
- 23 He M J, Chen W X, Dong X X. Polymer Physics (Revised edition) (in Chinese). Shanghai: Fudan University Press, 2005 [何曼君, 陈维孝, 董西侠. 高分子物理(修订版). 上海: 复旦大学出版社, 2005]
- 24 Stein P E, Leslie A G W, Finch J T, et al. Crystal structure of ovalbumin as a model for the reactive centre of serpins. *Nature*, 1990, 347: 99–102
- 25 Gao F X, Zhao X L, He X W, et al. A pH and temperature dual-responsive macroporous molecularly imprinted cryogel for enhanced recognition capability towards ovalbumin. *Anal Methods*, 2013, 5: 6700–6708
- 26 Gao F X, Ma X T, He X W, et al. Smart surface imprinting polymer nanospheres for selective recognition and separation of glycoprotein. *Colloids Surfaces A-Physicochem Eng Aspects*, 2013, 433: 191–199
- 27 Xie J, Zhong G, Cai C, et al. Rapid and efficient separation of glycoprotein using pH double-responsive imprinted magnetic microsphere. *Talanta*, 2017, 169: 98–103
- 28 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

补充材料

图S1 不同聚合物微球的金相显微镜照片

图S2 表面含环氧基的“活性”聚合物微球的SEM照片

图S3 MIP-PNIPAAm-6 h/CP-PNIPAAm-6 h在OVA, BSA与Lyz的PBS溶液中对各蛋白的吸附性能

表S1 MIP-PNIPAAm-6 h/CP-PNIPAAm-6 h在PBS溶液中对OVA, BSA及Lyz的选择性吸附

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 “表面具有非交联结构糖蛋白识别位点的分子印迹聚合物微球的可控制备”

Controlled preparation of molecularly imprinted polymer microspheres with surface uncrosslinked glycoprotein binding cavities

Lijie Huang, Congguang Zheng & Huiqi Zhang*

State Key Laboratory of Medicinal Chemical Biology, Key Laboratory of Functional Polymer Materials of Ministry of Education, Collaborative Innovation Center of Chemical Science and Engineering (Tianjin), and College of Chemistry, Nankai University, Tianjin 300071, China

*Corresponding author, E-mail: zhanghuiqi@nankai.edu.cn

Molecularly imprinted polymers (MIPs) are synthetic receptors with tailor-made recognition sites for target molecules. Their high affinity and selectivity, excellent stability, easy preparation, and low cost make them promising substitutes to biological receptors (e.g., antibody and enzyme) in many applications where molecular recognition is important. Despite significant progress made in the imprinting of small templates, the imprinting of biomacromolecules (e.g., proteins) remains a big challenge because of their large sizes, complexed structures, and conformational variability. These inherent characteristics of biomacromolecules lead to many significant problems for the resulting macromolecularly imprinted polymers (mMIPs) such as laborious removal of large templates and their slow access to the binding sites.

Recent years have witnessed much efforts being devoted to the development of mMIPs due to their great potential in proteome analysis, clinical diagnostics, and biomedicine. So far, some useful strategies have been developed for the imprinting of proteins, mainly including the bulk polymerization method, epitope imprinting strategy, and surface imprinting approach. Among them, the surface imprinting approach has been most widely used because it can readily lead to mMIPs with higher efficiency for removing large templates and more rapid template binding kinetics. Nevertheless, the presently developed mMIPs normally have crosslinked template binding sites, whose rigid structures might have negative influence on the removal of large templates and template binding kinetics. In this sense, the development of mMIPs with more flexible biomacromolecular binding cavities (e.g., uncrosslinked ones) should be useful for solving the above problems. To our knowledge, however, only rather limited numbers of publications relating to mMIPs with uncrosslinked binding sites have been disclosed, which are all based on the use of self-assembled monolayer strategy. The development of versatile new approaches for preparing mMIPs with uncrosslinked binding sites and good molecular imprinting effect is still highly desirable.

We demonstrate a facile and efficient new approach for the controlled preparation of MIP microspheres with surface uncrosslinked glycoprotein binding sites. It involves the first one-pot synthesis of uniform “living” polymer microspheres with both surface-bound epoxy groups and alkyl halide groups (i.e., atom transfer radical polymerization (ATRP)-initiating groups) via atom transfer radical precipitation polymerization, their surface modification with 3-aminophenylboronic acid (APBA) for introducing surface phenylboronic acid moieties and surface immobilization of a glycoprotein (ovalbumin (OVA)), subsequent use of the “living” polymer microspheres with surface-immobilized OVA as the ATRP initiator for the controlled grafting of poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAAm) brushes, and final removal of OVA. A series of MIP microspheres with surface uncrosslinked OVA binding sites were readily obtained following the above procedure by just changing the polymerization time for grafting PNIPAAm brushes, and their morphologies, chemical structures, surface hydrophilicity, water dispersion stability, and template binding properties were characterized in detail. The experimental results demonstrated that the above approach could effectively provide MIPs with excellent recognition ability toward OVA in the aqueous medium. The surface hydrophilicity and water dispersion stability of MIP microspheres were largely improved due to their surface-grafting of hydrophilic polymer brushes. Moreover, the chain length of PNIPAAm brushes showed significant influence on the template binding properties of MIP microspheres, and the best template binding capacity and specific binding were achieved for MIPs only when the thickness of PNIPAAm layers was close to the total length of the diameter of OVA plus the length of the surface-attached phenylboronic acid unit. Furthermore, the optimal MIP also exhibited good selectivity toward OVA over other proteins. The strategy presented here paves a new way for controlled and efficient preparation of glycoprotein-imprinted polymer microspheres with good molecular recognition capability.

molecularly imprinted polymers, glycoprotein, surface immobilization, controlled surface imprinting, hydrophilic polymer brushes, uncrosslinked binding sites

doi: [10.1360/N972018-01000](https://doi.org/10.1360/N972018-01000)