基于分子印迹的蛋白质识别及应用研究进展

贺燕庭, 白璟, 林子俺*

福州大学化学学院, 食品安全与生物分析教育部重点实验室, 福州 350116

* 联系人, E-mail: zianlin@fzu.edu.cn

2018-08-09 收稿, 2018-08-31 修回, 2018-09-06 接受, 2018-09-30 网络版发表

国家自然科学基金(21675025)、福建省自然科学基金(2018J01683)和莆田市科技局科技项目(2016N2016, 2016S3003)资助

摘要 分子印迹是制备具有模拟抗体分子识别特性材料的技术, 其制备方法简单、成本低、材料稳定性好, 已广泛应用于固相萃取、色谱分离、模拟酶催化、生物化学传感器、药物递送等领域. 分子印迹发展至今, 小分子印迹技术发展迅速, 而蛋白质分子印迹研究发展相对缓慢, 这主要和蛋白质复杂的自然属性有关. 虽然蛋白质分子印迹挑战巨大, 但是在国内外科研工作者的不懈努力下, 近年来蛋白质分子印迹已取得一定的研究进展, 其中不乏一些成功的新型蛋白质印迹策略. 这些性能优异、功能独特的新型蛋白质印迹材料, 已成功应用于蛋白组学、疾病诊断/治疗、生物成像等领域, 并表现出巨大的潜在应用价值. 本文总结了近10年以来蛋白质分子印迹的新方法、新策略和潜在应用前景, 分析了蛋白质分子印迹领域的发展现状及存在的挑战, 并展望了该领域的机遇和前景.

关键词 分子印迹, 蛋白质, 分子识别, 应用前景

分子印迹技术(molecular imprinting technology, MIT)是指人工定制对某一特定分子(模板分子)具有形状、尺寸、功能化位点特异性识别能力的聚合物的技术. 通俗地讲, 即为定制具有特异性识别“钥匙(模板)”的能力的“人工锁”的技术^[1]. 1931年, Polyakov^[2]制备了具有特异性吸附能力的硅胶, 并首次提出“分子印迹”的概念. 1940年, Pauling^[3]提出了利用抗原为模板合成三维结构互补的抗体的猜想, 为分子印迹技术的发展奠定了理论基础. 1972年, Wulff^[4]采用“共价印迹法”成功制备出分子印迹有机聚合物材料, 成为分子印迹发展史上里程碑式的突破, 分子印迹技术逐渐为人所知, 开始快速发展. 随后, 1993年, Mosbach课题组^[5]开创性地采用“非共价印迹法”成功制备了分子印迹聚合物材料. 1995年, Whitcombe课题组^[6]巧妙地将“共价印迹”和“非共价印迹”结合起来, 制备了“半共价”分子印迹聚合物材料. 自此, 分

子印迹技术开始呈爆炸式迅猛发展.

分子印迹聚合物(molecularly imprinted polymers, MIPs)是利用分子印迹技术制备能够特异性识别目标分子的高分子材料, 其制备过程通常包括: (1) 功能单体和模板分子通过自组装形成功能单体-模板分子复合物; (2) 功能单体-模板分子复合物和交联剂通过各种聚合方式交联聚合; (3) 通过合理的洗脱策略将模板分子移除, 形成在形状、尺寸、官能团及其排列等方面与模板分子互补的特异性识别空腔, 由此, 获得能够特异性识别模板分子或其结构类似物的分子印迹聚合物^[1], 其过程原理如图1所示^[7]. 基于分子印迹技术制备的分子印迹聚合物材料具有制备简单, 构效预定, 特异识别, 成本低, 耐高温、高压以及较大酸碱变化, 可重复利用等优良特性, 已成功应用于固相萃取、色谱分离、模拟酶催化、生物化学传感器、药物递送等领域^[1,8].

引用格式: 贺燕庭, 白璟, 林子俺. 基于分子印迹的蛋白质识别及应用研究进展. 科学通报, 2019, 64: 1392-1406

He Y T, Bai J, Lin Z A. Molecular imprinting for protein recognition: Current status, challenges and applications (in Chinese). Chin Sci Bull, 2019, 64: 1392-1406, doi: 10.1360/N972018-00803

图1 (网络版彩色)分子印迹技术原理及过程示意图^[7]

Figure 1 (Color online) Schematic diagram of the molecular imprinting process^[7]

1981年, Glad等人^[9]首次合成了蛋白质分子印迹材料用于模板蛋白的识别, 开启了国内外蛋白质分子印迹的研究。然而, 和小分子印迹相比, 蛋白质分子印迹的发展历程相对缓慢, 这主要和蛋白质的自然属性有关: (1) 蛋白质分子尺寸大, 极大地限制了模板分子在聚合物网络中的自由扩散; (2) 蛋白质表面功能基团复杂, 构象易发生变化, 常导致蛋白质分子印迹材料选择性变差; (3) 蛋白质大部分是水溶性的, 而理想的印迹材料合成条件基本是有机相, 蛋白质容易变性。这些因素直接限制了蛋白质分子印迹研究的发展。但是, 蛋白质分子识别涉及生物学、生物诊断、食品安全等诸多领域, 尤其是近年来组学的快速发展, 包括基因组学、蛋白组学、代谢组学等。各种蛋白质生物靶标分子不断涌现, 蛋白质分子印迹材料在临床检验、蛋白组学、疾病诊断、生物成像等领域表现出巨大的潜在应用价值。而传统的蛋白质分子印迹策略已难以满足现有的应用要求, 亟待开发新型的印迹方法。

尽管蛋白质分子印迹研究挑战巨大, 但通过国内外研究学者的不懈努力, 近10年来蛋白质分子印迹领域已取得一定的研究进展, 其中不乏一些成功的蛋白质分子印迹策略和应用。本文主要总结了近10年以来蛋白质分子印迹领域的印迹新方法及新策略的研究进展, 简要介绍了蛋白质分子印迹材料的应用前景。最后, 从已有的研究进展出发, 分析了蛋白质分子印迹领域的发展现状及存在的挑战, 并对

该领域的前景进行了展望。

1 蛋白质分子印迹方法

分子印迹技术发展至今, 合成分子印迹材料的方法多种多样, 但是, 因为蛋白质的自然属性限制, 蛋白质分子印迹材料的合成方法相对有限。传统的蛋白质分子印迹材料的合成方法主要包括: 整体印迹、表面印迹、抗原决定基印迹。

(1) 整体印迹亦称包埋法, 是将印迹分子、功能单体、交联剂、引发剂在溶剂中交联聚合后, 经过干燥、研磨、破碎、筛分等步骤, 得到一定尺寸的印迹小颗粒。这种方法简单易行, 适合大规模制备, 是早期蛋白质分子印迹经常使用的方法。但是, 这种方法弊端明显, 例如, 后处理程序复杂, 粉碎易破坏印迹位点, 蛋白不易洗脱、难以扩散到材料内部识别位点等。

(2) 表面印迹是将印迹位点修饰在具有一定机械稳定性的载体表面的印迹策略, 克服了整体印迹中模板蛋白洗脱和重新结合的传质问题, 是早期制备印迹涂层、薄膜材料尤其是色谱固定相的常用方法。

(3) 抗原决定基印迹是将与蛋白结构表面暴露的肽段序列(抗原决定基)相同的短肽作为模板, 印迹后的材料能同时识别短肽和完整蛋白。这种方法解决了蛋白模板不易获取且在溶剂中易变性的常见问题。

这些方法已被广泛用于蛋白质分子印迹材料的合成, 并取得了一定的研究成果。然而, 21世纪以来,

纳米技术、生物化学、组学、生命科学等领域快速发展,面对各种纳米材料、仿生材料的高选择性、高特异性要求,传统的单一的蛋白质分子印迹技术已难以满足需要.所以,亟待开发新型的蛋白质印迹方法、先进的蛋白质印迹策略,合成功能独特、性能优越的蛋白质分子印迹材料用于各个特殊领域.近年来,蛋白质分子印迹材料的合成方法研究已取得一定的进展,一系列先进的蛋白质印迹方法已不断涌现,如表1所示.

1.1 纳米骨架表面印迹

如上所述,传统表面印迹在印迹聚合物表面形成印迹位点,蛋白质更容易进出识别位点,有效解决了整体印迹的传质问题,非常适合生物大分子印迹,也是目前蛋白质分子印迹材料合成最常用的方法.但是,传统表面印迹往往在比表面积较低的微球粒子或固相基底^[67,68]表面进行,表面印迹位点有限,印迹材料吸附容量低,特异性不理想.纳米材料合成简便,比表面积大,具有大量的界面,已被广泛用于各个领域.因此,以纳米材料为骨架制备蛋白质分子印迹材料,往往会赋予其大比表面积、高结合容量、快速结合动力学等特点.

1.1.1 硅胶纳米粒子

硅胶纳米粒子制备简便、化学/机械稳定性强、生物兼容性好、粒径可控、表面可修饰,是蛋白质纳米骨架表面印迹广泛使用的载体.

自由基引发聚合是硅胶纳米骨架表面印迹常用

的方法,反应条件温和,常用单体有丙烯酸、丙烯酰胺等,该方法制备的印迹聚合物生物兼容性好,并有柔软的大孔结构,因此有利于体积庞大的蛋白质自由进出且不易变性. He等人^[10]采用3-氨丙基三甲氧基硅烷和马来酸酐修饰过的二氧化硅纳米粒子为基质,制备了溶菌酶表面印迹聚合物. 硅胶纳米粒子的预修饰,既能提供可聚合的双键,也引入了可与蛋白发生物理吸附的羧基,印迹聚合物的印迹因子和结合容量都得到很大提高. 本课题组^[11]以双键修饰的二氧化硅纳米粒子为基质,通过双键自由基聚合反应制备了溶菌酶表面印迹聚合物. 该方法制备简单,得到的印迹粒子形貌好、粒径均一,对溶菌酶表现出良好的选择性和特异性.

溶胶-凝胶反应条件温和,是在硅胶纳米粒子表面简易合成印迹层的另一种方法. 张玉奎课题组^[12]结合金属离子亲和色谱(IMAC)和蛋白质表面印迹,以固载金属离子的二氧化硅纳米粒子为基质, APTES和C8-TEOS为功能单体,制备得到金属配位硅胶纳米粒子表面印迹材料. 金属离子不仅能提供蛋白的螯合位点,方便蛋白模板的结合和移除,也能提高印迹粒子识别孔穴对模板蛋白的亲和能力. 本课题组^[13]以硼酸修饰的二氧化硅纳米粒子为基质, APTES和OTMS为功能单体,成功制备了硼酸修饰的糖蛋白表面印迹聚合物. 最近, Bhakta等人^[14]研究发现,多种有机硅烷化试剂的使用,可实现类似天然抗体结合位点的引入(图2). 该材料以 APTES, BTES, PTES, HMTEOS四种有机硅烷化试剂为功能单体,在氨基修饰的硅胶纳米粒子表面形成了亲水、疏水和氢键作用位点,从而实现对模板蛋白高选择性、高吸附容量的结合. 此方法制备简单,若对广谱蛋白都能实现强的亲和力和选择性,有望成为合成蛋白质分子印迹材料的普适途径,并代替天然受体.

聚多巴胺具有类似生物贻贝的黏附性,兼具水溶性和生物兼容性,水溶液或弱碱条件下可在纳米粒子表面自聚合,非常适合纳米粒子蛋白质表面印迹层的合成. 本课题组^[15]以小粒径的二氧化硅纳米粒子为基质,多巴胺为功能单体,制得牛血红蛋白印迹纳米复合硅球. 该表面印迹材料对模板蛋白表现出良好的选择性和吸附容量,并成功应用于实际样牛全血中BHb的选择性去除和富集.

1.1.2 磁性纳米粒子

磁性纳米粒子具有强磁响应,例如 Fe_3O_4 ,可通

表1 新型蛋白质分子印迹方法

Table 1 Summary of newly emerging protein imprinting methods

新型蛋白质分子印迹方法	载体	文献
纳米骨架表面印迹 (nanomaterial-based imprinting)	SiO_2	[10~15]
	Fe_3O_4	[16~24]
	量子点	[25,26]
	纳米线	[27~29]
	碳纳米管	[30~34]
硼酸亲和表面印迹(boronate affinity-based molecular imprinting)	石墨烯	[35~37]
	—	[13,38~47]
	—	[34,48~53]
	—	[54~60]
	—	[61~66]
抗原决定基印迹(epitope imprinting)	—	
固相合成(solid-phase synthesis)	—	
印迹后修饰 (post-imprinting modification)	—

图2 (网络版彩色)模拟抗体识别位点的蛋白质表面印迹原理示意图^[14]

Figure 2 (Color online) Antibody-like biorecognition sites for proteins from surface imprinting on nanoparticles^[14]

过溶剂热法^[69]或共沉淀法^[70]快速制备,用于蛋白质分子印迹材料制备的纳米骨架,可在外置磁场下从溶液中快速分离,避免离心、过滤等烦琐操作,大大缩短材料制备时间。此外,磁性纳米粒子生物兼容性好、毒性低、粒径可控,可重复利用,是目前蛋白质分子印迹最常用的基底。

磁性纳米粒子表面印迹层的合成方法和硅胶纳米粒子相似^[16-24],例如, Li等人^[17]在带有双键的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ 纳米粒子表面发生自由基聚合反应,制备了热响应牛血清白蛋白磁性表面印迹纳米粒子。Gao等人^[19]以固定模板蛋白的 Fe_3O_4 纳米粒子为基底,开发了一种溶胶-凝胶法(sol-gel)反应合成粒径均一的磁性蛋白表面印迹材料的普适方法。该研究以4种等电点不同的蛋白为模板,成功制备了对应的4种磁性蛋白表面印迹纳米粒子,其中以 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{BHB-MIPs}$ 的选择性最好。该印迹材料成功用于牛血实际样中BHB的分离,证明其具有一定的实际应用价值。最近, Bhakta等人^[21]在之前的研究工作^[14]基础上,引入硅胶包覆的磁性内核作为基底,提高了该材料的重复利用性,拓展了其在生物分离领域的应用。Zhou等人^[22]通过多巴胺自聚得到人血红蛋白表面印迹磁性纳米粒子,该材料对模板蛋白表现出良好的选择性和吸附容量。Zhang等人^[23]采用类似的方法,以带羧基的 Fe_3O_4 为基底,制备了溶菌酶表面印迹磁性材料。在此基础上, Wan等人^[24]利用硅胶层保护的 Fe_3O_4 纳米粒子,得到多巴胺包覆的溶菌酶表面印迹磁性纳米粒子,并首次将其用于MALDI-TOF-MS分析蛋白

质前的溶菌酶选择性富集。

1.1.3 量子点

量子点是一种新型的化学、生物荧光材料,稳定性好,发射波长可随粒子尺寸变化,已被广泛用于生物传感和成像^[71,72]。目前,量子点和抗体的复合材料已被应用于生物靶向领域^[73]。作为人工抗体的蛋白质分子印迹材料,与量子点结合,将赋予蛋白质表面印迹材料新的性能。

Zhang等人^[25]以变性BSA修饰的碲化镉量子点(CdTe QDs)为基底,通过sol-gel表面印迹法,制备了CdTe QDs蛋白质表面印迹人工受体,用于蛋白质的选择性亲和识别和检测。该材料结合了蛋白质表面印迹的优势和量子点的荧光特性。量子点表面修饰上变性的BSA,不仅能增强量子点的荧光强度,还能增加印迹识别位点。随后, Yang等人^[26]结合抗原决定基表面印迹,以BSA的C-端短肽为模板,在硅球包裹的CdTe QDs表面合成了蛋白质表面印迹层。该材料不仅能识别肽段模板,对BSA同样具有强亲和识别能力。

1.1.4 纳米线

早期的蛋白质表面印迹纳米线是由氧化铝模型法合成的^[27,28]。这类方法首先在阳极氧化铝膜的平行纳米孔道内壁固定好蛋白模板,再通过多巴胺或者自由基聚合反应形成聚合物,氧化铝膜和模板被移除后,得到蛋白质表面印迹纳米线。由于纳米线外表面积大,识别位点都暴露在外表面,因此该材料对模板蛋白具有较高的吸附容量和较快的吸附动力学。

随后,Chen等人^[29]设计合成了表面积大、生物兼容性好、易被分离的硅基纳米线,并用多巴胺作为功能单体,制备了BHb表面印迹纳米线.这种表面印迹硅基纳米线对模板蛋白的吸附容量高、选择性强,5 min内即可到达75%的吸附平衡.此材料制备简单,水分散性好,可重复利用,非常适合生物分离分析领域.

1.1.5 碳纳米管

碳纳米管,包括单壁碳纳米管(single-walled carbon nanotubes, SWCNT)和多壁碳纳米管(multi-walled carbon nanotubes, MWCNT),是一种生物兼容性好、稳定性好、表面积大的碳材料,已被广泛用于生物医学领域,同样可作为蛋白质表面印迹的基质^[30~34].

本课题组^[30]将纳米材料酶抑制剂和分子印迹结合,开发了一种 α -糜蛋白酶单壁碳纳米管表面印迹聚合物人工酶抑制剂.分子印迹技术的引入,单壁碳纳米管对 α -糜蛋白酶的抑制作用的选择性显著增强.同时,这是一种制备人工纳米酶抑制剂的普适途径,有望代替小分子成为临床治疗酶抑制剂. Gao等人^[31]以磁性单壁碳纳米管为基质,制备了多巴胺包覆的溶菌酶磁性单壁碳纳米管表面印迹材料,并成功应用于鸡蛋清中特异性、选择性分离溶菌酶. Liu等人^[33]采用硅烷化试剂修饰的多壁碳纳米管为基质,引入离子液体作为功能单体,利用溶胶-凝胶反应合成了pH响应的BSA多壁碳纳米管表面印迹材料.

1.1.6 石墨烯

石墨烯是一种前沿的二维纳米材料,在能源、生物材料、环境等方面具有优异的性能和广阔的应用前景.和球状纳米粒子相比,石墨烯具有更大的表面积和比表面积,非常适合大分子表面印迹,可显著提高目标模板的吸附容量,降低模板蛋白和印迹孔穴识别位点的传质阻力^[35~37].

Luo等人^[35]利用多巴胺自聚反应,在氧化石墨烯表面一步合成BHb表面印迹聚合物层.由于二维石墨烯的大表面积,该蛋白质表面印迹材料表面具有更多识别位点,更方便模板蛋白和印迹位点的亲和识别,因此,材料对模板蛋白的吸附容量大,且5 min即可达到89%的平衡吸附容量.随后,Chen等人^[36]利用共沉淀反应,将 Fe_3O_4 纳米粒子引入到石墨烯表面,得到制备简便、可重复利用的磁性BSA石墨烯表面印迹材料.但是,和整体印迹的三维(3D)印迹孔穴相比,二维纳米材料表面印迹的选择性通常不

尽如人意.为此,Luo等人^[37]将特异性强的硼酸亲和作用和二维石墨烯结合,制备了吸附容量高、选择性强的硼酸亲和石墨烯表面印迹聚合物材料.

总的来说,纳米骨架表面印迹是蛋白质分子印迹使用最广泛、最基本的方法.纳米材料比表面积大、成本低、制备简单,制备得到的纳米骨架蛋白表面印迹材料吸附容量高,具有更快的结合动力学.同时,和特殊的纳米材料结合,纳米骨架蛋白表面印迹材料往往还能被赋予新的独特性能,比如,磁响应、荧光等.但是,和小分子印迹相比,仅仅纳米材料的引入,还不能解决蛋白质分子印迹的问题,比如特异性强、选择性好的蛋白质印迹材料的普适合成,大规模制备,以及用于人体的生物兼容性好、可控粒径印迹材料的开发等.针对这些问题,亟须开发更多新的蛋白质分子印迹方法和策略.

1.2 硼酸亲和表面印迹

硼酸亲和识别的原理是硼酸可与含有顺式二羟基的分子,比如糖,发生可逆共价结合:碱性条件下共价结合,酸性条件下解离.糖蛋白含有大量的顺式二羟基,可与硼酸发生特异性的结合.随着蛋白组学和生命科学的快速发展,研究发现,糖蛋白和许多疾病的发生密切相关,糖蛋白已经成为临床诊断的重要疾病标志物和治疗靶标.由于具有重要生理意义或诊断价值的糖蛋白的表达丰度极低,对复杂样品体系中糖蛋白的专一识别和灵敏检测是重要的挑战性课题.作为天然抗体的替代物,分子印迹材料在糖蛋白亲和和识别领域大有可为.目前,硼酸亲和表面印迹是糖蛋白印迹中最主要、最有效的方法.

近年来,本课题组在糖蛋白分离富集方向做了一些研究.首先,开发了一种管内固相微萃取选择性分离富集糖蛋白的硼酸亲和表面印迹整体柱,可用于辣根过氧化物酶(HRP)的特异性吸附,印迹因子可达2.76^[38].这种表面印迹整体柱被成功用于人血清中HRP的选择性分离,证明在糖蛋白分离纯化方向具有实际应用价值.此外,以双键修饰的硅球为基质,通过硅烷化试剂APTES和OTMS的sol-gel反应,合成了硼酸亲和表面印迹硅球纳米粒子^[13].该印迹纳米粒子对模板蛋白表现出良好的选择性,印迹因子为2.71.随后,采用巯基点击在硅球纳米粒子表面修饰上硼酸,以此为基质,制备了多巴胺包覆的硼酸亲和表面印迹纳米粒子^[39].

南京大学刘震课题组^[40]在硼酸亲和糖蛋白表面印迹方向做了一系列出色的工作,开发了多种硼酸亲和和表面印迹材料的普适、高效的制备方法和策略,并成功应用于临床诊断^[41,42]、亲和分离^[43]、免疫测定^[44]、酶活性测定^[45]、癌细胞靶向^[46]、活体单细胞分析^[54]等领域。首先,他们开发了一种光刻硼酸亲和和分子印迹法^[40,41](photolithographic boronate affinity molecular imprinting),在基于取代基硼酸的紫外引发聚合下,制备了糖蛋白大孔印迹整体薄层的微阵列芯片。该微阵列芯片具有强特异性、强亲和力、强抗干扰能力、生物相容性pH等诸多优点,并成功用于人血清中痕量肝癌标志物(甲胎蛋白,AFP)的临床检测。这种紫外引发聚合的方法适合于表面可接受光照射的材料。然后,他们就分子印迹材料的可控合成问题,发展了一种硼亲和可控定向表面印迹法^[43](boronate affinity controllable-oriented surface imprinting),高效、便捷地制备出糖蛋白、聚糖和单糖的硼酸亲和和表面印迹聚合物。该方法的原理见图3,先将模板分子固定到硼酸功能化的基质上,然后利用生物相容性良好的功能单体在基质表面聚合,形成合适厚度的印迹层以及与模板分子空间匹配的印迹腔。该方法的最大优势在于印迹可控性:根据模板分子尺寸大小,调整印迹层厚度,制备出不同尺寸模板的分子印迹聚合物,而印迹层厚度只需要调节印迹时间来精确控制。这不仅简化了印迹步骤,而且适用范围广。由此方法制备的印迹材料特异性强、选择性好、亲和能力强、抗干扰能力强、识别pH生物兼容,已成功应用于亲和分离^[43]、免疫测定^[44]、酶活性测定^[45]、癌细胞靶向识别^[46]、活体单细胞分析^[47]等。

硼酸亲和和表面印迹发展至今,已经能够对糖蛋

白进行高选择性、高特异性的亲和识别,并应用到蛋白组学、生物成像、临床诊断等领域,尤其是刘震课题组发展的普适的硼亲和可控定向表面高效印迹法,展现了优越的分子识别性能。因此,虽然硼亲和可控定向表面高效印迹法对蛋白类型是有局限性的,但它的成功,无疑是对蛋白分子印迹研究工作者的鼓励和借鉴。

1.3 抗原决定基印迹

根据抗体通过抗原决定簇识别抗原的机理,Rachkov和Minoura^[74]发展了另一种蛋白质印迹方法,即以蛋白质表面暴露的一小段短肽为模板进行印迹的抗原决定基印迹,得到的印迹材料对模板肽段和蛋白同时具有识别作用。和以蛋白质为模板的印迹方法相比,这种方法,肽段更易获取,适合于大多数的合成条件。同时,肽段结构简单、稳定,得到的印迹位点特异性更强。

近年来,张玉奎课题组^[34,48-53]在蛋白质抗原决定基印迹方向做了一系列的工作,开发了多种新型抗原决定基蛋白质印迹材料。2014年,该课题组通过聚醚砜自组装,以转铁蛋白的N-端九肽为模板,合成制备了转铁蛋白抗原决定基聚醚砜印迹聚合物材料^[48]。这种材料可以同时识别模板肽段和转铁蛋白,并首次用于人血浆蛋白的分析和定量,有望成为蛋白质抗原决定基印迹材料制备的普适方法。随后,该课题组尝试同时使用3种蛋白的N-端肽段作为模板,聚醚砜自组装制备多模板抗原决定基印迹材料(图4)^[49]。模板移除后,该印迹材料依然可同时高选择性富集3种模板肽段以及对应的3种蛋白,并成功用于人血浆复杂样。

图3 (网络版彩色)硼亲和可控定向表面印迹原理示意图^[43]

Figure 3 (Color online) Schematic diagram of boronate affinity-based controllable oriented surface imprinting of glycoproteins^[43]

图4 (网络版彩色)多模板抗原决定基印迹原理示意图^[49]

Figure 4 (Color online) Schematic diagram of multi-epitope templates imprinted particles^[49]

通常来讲,模板蛋白/肽段很难通过非共价作用固定在纳米材料表面,从而影响印迹材料的制备效率和选择性.张玉奎课题组^[34,50~53]将金属配位作用引入到蛋白质抗原决定基印迹中,开发了多种抗原决定基金属配位表面印迹材料.例如,以 Ni^{2+} 修饰的 Fe_3O_4 为基质,组氨酸标记的HSA C-端九肽为模板,得到多巴胺包覆的抗原决定基定向表面印迹纳米粒子^[51]. Ni^{2+} 强配位作用的引入,模板固定率可达100%.同时,模板又可被EDTA竞争移除,极大地提高了印迹材料的制备效率.随后,他们优化洗脱剂^[53],采用咪唑竞争洗脱模板,保留了印迹位点内的 Ni^{2+} ,显著提高了印迹材料对目标蛋白的亲和力.最近,Qin等人^[34]以细胞色素C(Cyt C)的C-端九肽为模板,醋酸锌为功能单体,合成了磁性单壁碳纳米管Cyt C抗原决定基表面印迹材料.通过引入 Zn^{2+} 和蛋白/肽段的六元环状作用力,印迹材料对Cyt C表现出强亲和识别能力,吸附容量为780 mg/g,印迹因子高达11.7.

抗原决定基表面印迹的最大优势在于,只要获取目标蛋白的肽段序列,就可以其中一段肽段为模板制备出相应的蛋白质印迹材料.尤其是,有些抗体

在生物过程中非常重要但又不易获取,这种方法则是最好的选择.但同时缺点也很明显,对于肽段序列未知的蛋白,抗原决定基印迹是无能为力的.

1.4 固相合成

传统分子印迹聚合物的合成费时费力,不适合连续生产.为此,Poma等人^[54]在2013年首次报道了固相合成分子印迹聚合物的新方法.固相合成将模板固定在载体,如微米级硅球上,经过自由基聚合、在线纯化、洗脱等步骤,即可得到表面印迹纳米聚合物粒子(图5).该方法生产效率高、模板可重复利用,适合工业生产,得到的纳米分子印迹聚合物识别位点均一、亲和力强、溶解性好、稳定性强,具有和单克隆抗体相当的特异性、尺寸,在临床诊断、生物分析领域有潜在的应用价值.近年来,固相合成在蛋白质表面印迹中的报道相对较少^[55~60],主要局限还是在于蛋白质的自然属性.

Ambrosini等人^[56]首次采用固相合成法成功制备了胰蛋白酶热响应表面印迹纳米聚合物.胰蛋白酶通过底物对氨基苯甲脒固定在固相载体玻璃珠上,

图5 (网络版彩色)固相合成分子印迹纳米粒子原理示意图^[54]

Figure 5 (Color online) Schematic diagram of the solid-phase synthesis of MIP nanoparticles^[54]

然后, 填充进玻璃柱, 进行水相自由基聚合、在线纯化、低温响应洗脱, 得到表面印迹聚合物. 该方法的优势在于, 胰蛋白酶固定在玻璃球表面的取向一致, 可得到均一的印迹位点. 2014年, Poma等人^[57]在小分子固相合成研究基础上, 蛋白被戊二醛偶联固定在固相载体上, 水相自动化在线制备了3种蛋白的表面印迹纳米聚合物粒子. 该自动化纯化方法缩短了生产时间, 具有大规模制备的工业生产潜力.

近年来, 固相合成新型蛋白质表面印迹聚合物的工作陆续被报道. 例如, Xu等人^[58]引入金属离子配位作用, 以期开发一种通用的固定蛋白固相合成策略. 为解决靶蛋白价格昂贵、不易获取和易变性的弊端, Cecchini等人^[59]首次将抗原决定基表面印迹和固相合成结合, 制备了量子点掺杂的人血管内皮生长因子(hVEGF)表面印迹纳米粒子, 并成功应用于肿瘤细胞中hVEGF过度表达的生物成像. Xu等人^[60]对固相合成得到的胰蛋白酶表面印迹纳米粒子进行荧光素FITC修饰, 并应用于人血清中胰蛋白酶的免疫定量.

总之, 纳米尺寸的表面印迹粒子是抗体的理想

替代物, 固相合成可以大规模工业生产印迹纳米粒子, 因此, 固相合成有潜力成为蛋白质分子印迹中最有效、通用的印迹策略.

1.5 印迹后修饰

传统的分子印迹聚合物通常只有单一的分子识别功能, 特殊性能的获得往往需要借助特殊的基质, 如纳米材料. Takeuchi课题组^[61]受到蛋白质翻译后修饰的启发, 发展了一种印迹后修饰的新方法(图6). 该方法的主要机理是对印迹空穴中的特殊功能单体进行位点特异性修饰, 通过化学修饰的方式赋予印迹聚合物新的性能, 比如荧光信号、结合活性开/关转换、结合特性精细调节等. 例如, Suga等人^[62]利用二硫键可裂解单体进行印迹后修饰, 制备了细胞色素C的荧光印迹聚合物. 二硫键还原裂解后, 模板蛋白被移除, 荧光团与印迹空穴中暴露出来的巯基反应, 被成功修饰在印迹空穴中. 通过位点特异性地修饰荧光基团后, 该印迹聚合物被赋予了荧光性能, 对模板的特异性结合可转化为荧光信号的改变. 随后, Sunayama等人^[63,64]优化了印迹后修饰的方法, 使荧

图6 (网络版彩色)印迹后修饰原理示意图^[61]

Figure 6 (Color online) Schematic illustration of post-imprinting modification of the binding cavities of MIPs^[61]

光团的位点特异性修饰尽可能发生在印迹空穴内,降低检测模板蛋白结合的荧光背景噪声。

随后, Horikawa等人^[65]提出了一种制备超越天然抗体的多功能分子印迹聚合物的印迹后修饰策略。该策略以甲胎蛋白(AFP)为模板,采用精细设计的印迹孔穴可控印迹后修饰方法,同时引入特异性更强的识别位点和荧光探针,得到为AFP“量身定制”的分子印迹荧光人工抗体。这种人工抗体可以高选择性、高灵敏度检测AFP,稳定性好、制作成本低,且具有天然抗体无法拥有的荧光性能,在生物科学和生物工业领域有潜在应用价值。Zhao等人^[66]利用硫烯点击的位点特异性修饰硼酸基团的方法,一步合成同时具有硼酸亲和能力和荧光性能的HRP分子印迹聚合物。

蛋白质印迹后修饰策略是近年来发展起来的一种巧妙的蛋白质印迹方法。它最大的优势在于,印迹聚合物的稳定性,允许它通过各种化学修饰获取天然抗体不具备的性能,真正实现“量身定制”。但是,特殊功能单体的选择,后修饰的多步操作,是印迹后修饰最大的弊端。因为蛋白质印迹的识别机理还不完善,且印迹后修饰起步较晚,它仍需要更加深入、系统的研究。

2 蛋白质分子印迹的应用前景

由于蛋白质自然属性的限制,早期印迹策略的缺乏,传统蛋白质印迹材料的应用,主要局限于分析化学和生物化学领域。然而,在国内外科研工作者的不懈努力下,近年来蛋白质印迹方法得到不断的升级和创新,蛋白质印迹材料的功能被不断挖掘,目前已被用于模拟抗体、蛋白组学、临床诊断和治疗、生物成像等领域,并表现出良好的应用前景。

2.1 分离纯化

纳米骨架蛋白质表面印迹材料,吸附容量高,结合动力学快,非常适合生物复杂样品中的蛋白质高效分离纯化。本课题组^[15]和Gao等人^[19]分别通过多巴胺自聚和sol-gel反应制备的BHb印迹纳米粒子,成功用于牛血中BHb的分离。张玉奎课题组^[48,49]制备了聚醚砜抗原决定基印迹材料用于人血浆蛋白的分析和定量。刘震课题组^[43]和本课题组^[38]利用硼酸亲和印迹整体柱,对人血清中的糖蛋白进行了分离富集。

2.2 模拟受体/抗体

Cutivet等人^[75]首次制备了胰蛋白酶分子印迹抑制剂,酶抑制作用明显优于小分子抑制剂苯甲脒。

Zhang等人^[76]通过可控自由基聚合表面印迹,优化印迹层厚度,制备了高选择性的胰蛋白酶核壳分子印迹抑制剂.酶抑制剂的效价要比小分子抑制剂高出3个数量级.此外,为开发一种普适的分子印迹酶抑制剂合成方法,本课题组^[30]以单壁碳纳米管为抑制剂和印迹基质,利用多巴胺自聚,可控合成了一定厚度的 α -糜蛋白酶印迹层(图7).结果表明,印迹后,单壁碳纳米管对 α -糜蛋白酶抑制作用的选择性显著增强.该印迹方法对其他的酶同样有效.

2010年,Shea课题组^[77]证明印迹纳米粒子人工抗体可以提高注射蜂毒毒素的小鼠的存活率.受此启发,Piszkiewicz等人^[78]制备了对莫桑比克眼镜蛇蛇毒有结合活性的丙烯酰胺印迹纳米粒子人工抗体.虽然该研究并未开展动物实验,但证明了人工抗体在提高毒蛇咬伤存活率方向的潜力.

2.3 蛋白质组学

基质辅助激光解析离子化质谱(MALDI-TOF-MS)是蛋白质组学分析中蛋白质鉴定常用的一种工具,但是目标蛋白的质谱信号容易被复杂样品中高丰度蛋白和基质抑制,所以,质谱鉴定前通常会对目标蛋白/肽段进行分离富集.2015年,Wan等人^[24]制备了多巴胺包覆的溶菌酶表面印迹磁性纳米粒子,并首次用于鸡蛋清中溶菌酶的MALDI质谱鉴定,通过印迹粒子分离富集后,质谱信号显著增强.随后,Bertolla等人^[79]采用抗原决定基印迹法直接在MALDI靶板上制备了溶剂响应的转铁蛋白印迹纳米水凝胶,并成功用于人血清中转铁蛋白的分离富集和质谱鉴定.该方法简单、高效,可直接鉴定人血清的蛋白和肽段,

在临床检测中有应用潜力.

2.4 医疗诊断

基于糖蛋白在临床癌症诊断中的重要性,刘震课题组开发了一系列替代抗体检测癌症标志物糖蛋白的高灵敏方法.首先,采用光刻硼酸亲和分子印迹法,制备了硼酸亲和大孔印迹整体薄层的微阵列芯片,并将其用于人血清甲胎蛋白AFP的ELISA检测^[48].然后,以96孔板为基质,采用定向表面印迹法,合成了硼酸亲和表面印迹层,并成功用于人血清中甲胎蛋白AFP的ELISA检测^[52].两种方法对人血清中AFP的检测限都达到临床检测标准.但是,为完全取代ELISA中抗体和酶的使用,刘震课题组^[42]开发了一种硼酸亲和夹心法(图8),成功应用于人血清中AFP的检测,并达到临床标准.该方法简单快速、成本低、稳定性好,具有良好的临床诊断应用前景.

2.5 生物成像

Liu等人^[80]采用一步表面引发原位聚合,合成了生物兼容性好、稳定性好、特异性强的荧光标记磁性蛋白质印迹纳米粒子,并首次用于活体细胞内目标蛋白的光学追踪.该印迹纳米粒子可进行细胞跨膜,且对细胞没有伤害,可应用于生物学和生物医学领域.Cecchini等人^[59]首次将抗原决定基表面印迹和固相合成结合,制备了量子点掺杂的人血管内皮生长因子(hVEGF)表面印迹纳米粒子,并成功应用于肿瘤细胞中hVEGF过度表达的生物成像.同时,该印迹纳米粒子经过改性,还可用于潜在发病因素筛查、临床磁共振成像、早期肿瘤的无创检测和治疗、替代

图7 (网络版彩色)单壁碳纳米管 α -糜蛋白酶表面印迹原理示意图^[30]

Figure 7 (Color online) Schematic illustration of MWCNT-MIP as ChT-selective inhibitor^[30]

图8 (网络版彩色)硼酸亲和夹心法原理示意图^[42]

Figure 8 (Color online) Schematic diagram of the boronate-affinity sandwich assay of glycoproteins^[42]

单抗等临床诊疗领域。

3 结论

综上所述,近年来,蛋白质分子印迹领域取得了一定的研究进展,发展了一系列新颖、独特的蛋白质印迹方法和策略,包括纳米骨架表面印迹、硼酸亲和表面印迹、抗原决定基印迹、固相合成印迹、印迹后修饰等。和传统蛋白质印迹策略相比,这些方法有效解决了蛋白质分子印迹领域中存在的瓶颈问题。例如,纳米骨架表面印迹极大地提高了模板蛋白的传质速率和结合容量,还可通过引入独特的材料赋予其新的性能;硼酸亲和表面印迹对糖蛋白具有普适的高选择性、特异性的亲和识别能力,且已成功应用于蛋白分离纯化、临床诊断等领域;抗原决定基印迹适用于所有新型的蛋白质印迹策略,可有效避免蛋白价格昂贵、不易获取、容易变性等问题;固相合成印迹可大规模合成蛋白印迹纳米粒子,有望解决蛋白质印迹材料商业化的问题;印迹后修饰策略通过化学修饰的方法,可“量身定制”超越天然抗体的性能独特的人工抗体。同时,各种新型蛋白质分子印迹方法和材料的出现,拓展了蛋白质印迹材料的应用

领域,一些性能优异、功能独特的蛋白质印迹材料在蛋白质组学、模拟抗体/受体、临床诊断和治疗、生物成像等领域表现出良好的应用前景。

尽管蛋白质分子印迹获得了一定的研究进展,但是和已经实现商业化的小分子印迹相比,蛋白质分子印迹要解决的问题还很多。正如Wulff^[81]在最近的综述中提到:生物大分子印迹仍然存在很多问题,而我们并不清楚,获得的印迹材料对相似蛋白是否依然具有高选择性。并且,从已有的研究成果不难发现,现有的蛋白质分子印迹方法更多的是解决了蛋白质印迹中的一类问题。迄今为止,通用性好、适应性强的蛋白质印迹方法还未出现。因此,开发普适、通用的蛋白质分子印迹方法依然是蛋白质分子印迹领域的主要挑战和目标。然而,21世纪以来,纳米技术、材料科学、组学、生命科学等学科蓬勃发展,蛋白质分子印迹作为多学科交叉的领域,学科之间的交叉融合、相互借鉴,是蛋白质分子印迹的重要发展机遇。在很长的一段时间内,发展新型的蛋白质印迹策略,赋予蛋白印迹材料新的性能,挖掘蛋白质印迹材料的潜在应用领域,依然是蛋白质分子印迹今后的主要方向。

参考文献

- 1 Chen L X, Wang X Y, Lu W H, et al. Molecular imprinting: Perspectives and applications. *Chem Soc Rev*, 2016, 45: 2137–2211
- 2 Polyakov M V. Adsorption properties and structure of silica gel. *Zhur Fiz Khim*, 1931, 2: 799–805
- 3 Pauling L. A theory of the structure and process of formation of antibodies. *J Am Chem Soc*, 1940, 62: 2643–2657
- 4 Wulff G. The use of polymers with enzyme-analogous structures for the resolution of racemates. *Angew Chem Int Ed*, 1972, 11: 341–345
- 5 Vlatakis G, Andersson L I, Müller R, et al. Drug assay using antibody mimics made by molecular imprinting. *Nature*, 1993, 361: 645–647

- 6 Whitcombe M J, Rodriguez M E, Villar P, et al. A new method for the introduction of recognition site functionality into polymers prepared by molecular imprinting: Synthesis and characterization of polymeric receptors for cholesterol. *J Am Chem Soc*, 1995, 117: 7105–7111
- 7 Alexander C, Andersson H S, Andersson L I, et al. Molecular imprinting science and technology: A survey of the literature for the years up to and including 2003. *J Mol Recognit*, 2006, 19: 106–180
- 8 Chen L X, Xu S F, Li J H. Recent advances in molecular imprinting technology: Current status, challenges and highlighted applications. *Chem Soc Rev*, 2011, 40: 2922–2942
- 9 Glad M, Norrlov O, Sellerger B, et al. Use of silane monomers for molecular imprinting and enzyme entrapment in polysiloxane-coated porous silica. *J Chromatogr A*, 1985, 347: 11–23
- 10 He H Y, Chai Z, Chen H, et al. Enhanced lysozyme imprinting over nanoparticles functionalized with carboxyl groups for noncovalent template sorption. *Anal Chem*, 2011, 83: 1431–1436
- 11 Lin Z A, Xia Z W, Zheng J N, et al. Synthesis of uniformly sized molecularly imprinted polymer-coated silica nanoparticles for selective recognition and enrichment of lysozyme. *J Mater Chem*, 2012, 22: 17914–17922
- 12 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
- 13 Lin Z A, Sun L X, Liu W, et al. Synthesis of boronic acid-functionalized molecularly imprinted silica nanoparticles for glycoprotein recognition and enrichment. *J Mater Chem B*, 2014, 2: 637–643
- 14 Bhakta S, Seraji M S I, Suib S L, et al. Antibody-like biorecognition sites for proteins from surface imprinting on nanoparticles. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2015, 7: 28197–28206
- 15 Xia Z W, Lin Z A, Xiao Y, et al. Facile synthesis of polydopamine-coated molecularly imprinted silica nanoparticles for protein recognition and separation. *Biosens Bioelectron*, 2013, 47: 120–126
- 16 Gai Q Q, Qu F, Liu Z J, et al. Superparamagnetic lysozyme surface-imprinted polymer prepared by atom transfer radical polymerization and its application for protein separation. *J Chromatogr A*, 2010, 1217: 5035–5042
- 17 Li X, Zhang B, Li W, et al. Preparation and characterization of bovine serum albumin surface-imprinted thermosensitive magnetic polymer microsphere and its application for protein recognition. *Biosens Bioelectron*, 2014, 51: 261–267
- 18 Cao J L, Zhang X H, He X W, et al. The synthesis of magnetic lysozyme-imprinted polymers by means of distillation-precipitation polymerization for selective protein enrichment. *Chem Asian J*, 2014, 9: 526–533
- 19 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
- 20 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 Fe_3O_4 nanoparticles for specific recognition of bovine hemoglobin. *J Mater Chem B*, 2014, 2: 1733–1741
- 21 Bhakta S, Dixit C K, Bist I, et al. Albumin removal from human serum using surface nanopockets on silica-coated magnetic nanoparticles. *Chem Commun*, 2017, 53: 9254–9257
- 22 Zhou W H, Lu C H, Guo X C, et al. Mussel-inspired molecularly imprinted polymer coating superparamagnetic nanoparticles for protein recognition. *J Mater Chem*, 2010, 20: 880–883
- 23 Zhang M, Zhang X, He X, et al. A self-assembled polydopamine film on the surface of magnetic nanoparticles for specific capture of protein. *Nanoscale*, 2012, 4: 3141–3147
- 24 Wan W, Han Q, Zhang X, et al. Selective enrichment of proteins for MALDI-TOF MS analysis based on molecular imprinting. *Chem Commun*, 2015, 51: 3541–3544
- 25 Zhang W, He X W, Chen Y, et al. Molecularly imprinted polymer anchored on the surface of denatured bovine serum albumin modified CdTe quantum dots as fluorescent artificial receptor for recognition of target protein. *Biosens Bioelectron*, 2012, 31: 84–89
- 26 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
- 27 Li Y, Yang H H, You Q H, et al. Protein recognition via surface molecularly imprinted polymer nanowires. *Anal Chem*, 2006, 78: 317–320
- 28 Ouyang R, Lei J, Ju H. Surface molecularly imprinted nanowire for protein specific recognition. *Chem Commun*, 2008, 44: 5761–5763
- 29 Chen T, Shao M, Xu H, et al. Molecularly imprinted polymer-coated silicon nanowires for protein specific recognition and fast separation. *J Mater Chem*, 2012, 22: 3990–3996
- 30 Zheng C, Zhang X L, Liu W, et al. A selective artificial enzyme inhibitor based on nanoparticle-enzyme interactions and molecular imprinting. *Adv Mater*, 2013, 25: 5922–5927

- 31 Gao R, Zhang L, Hao Y, et al. Novel polydopamine imprinting layers coated magnetic carbon nanotubes for specific separation of lysozyme from egg white. *Talanta*, 2015, 144: 1125–1132
- 32 Yin Y, Yan L, Zhang Z, et al. Magnetic molecularly imprinted polydopamine nanolayer on multiwalled carbon nanotubes surface for protein capture. *Talanta*, 2015, 144: 671–679
- 33 Liu M, Pi J, Wang X, et al. A sol-gel derived pH-responsive bovine serum albumin molecularly imprinted poly(ionic liquids) on the surface of multiwall carbon nanotubes. *Anal Chim Acta*, 2016, 932: 29–40
- 34 Qin Y P, Li D Y, He X W, et al. Preparation of high-efficiency cytochrome *c*-imprinted polymer on the surface of magnetic carbon nanotubes by epitope approach via metal chelation and six-membered ring. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2016, 8: 10155–10163
- 35 Luo J, Jiang S, Liu X. Efficient one-pot synthesis of mussel-inspired molecularly imprinted polymer coated graphene for protein-specific recognition and fast separation. *J Phys Chem C*, 2013, 117: 18448–18456
- 36 Chen F, Zhao W, Zhang J, et al. Magnetic two-dimensional molecularly imprinted materials for the recognition and separation of proteins. *Phys Chem Chem Phys*, 2016, 18: 718–725
- 37 Luo J, Huang J, Cong J, et al. Double recognition and selective extraction of glycoprotein based on the molecular imprinted graphene oxide and boronate affinity. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2017, 9: 7735–7744
- 38 Lin Z A, Wang J, Tan X Q, et al. Preparation of boronate-functionalized molecularly imprinted monolithic column with polydopamine coating for glycoprotein recognition and enrichment. *J Chromatogr A*, 2013, 1319: 141–147
- 39 Sun L X, Lin D, Lin G, et al. Click synthesis of boronic acid-functionalized molecularly imprinted silica nanoparticles with polydopamine coating for enrichment of trace glycoproteins. *Anal Methods*, 2015, 7: 10026–10031
- 40 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 Prot*, 2017, 12: 964
- 41 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, 125: 7599–7602
- 42 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
- 43 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
- 44 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
- 45 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
- 46 Wang S, Yin D, Wang W, et al. Targeting and imaging of cancer cells via monosaccharide-imprinted fluorescent nanoparticles. *Sci Rep*, 2016, 6: 22757
- 47 Liu J, Yin D, Wang S, et al. Probing low-copy-number proteins in a single living cell. *Angew Chem Int Ed*, 2016, 128: 13409–13412
- 48 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
- 49 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
- 50 Yan Y J, He X W, Li W Y, et al. Nitrogen-doped graphene quantum dots-labeled epitope imprinted polymer with double templates via the metal chelation for specific recognition of cytochrome *c*. *Biosens Bioelectron*, 2017, 91: 253–261
- 51 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
- 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 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
- 54 Poma A, Guerreiro A, Whitcombe M J, et al. Solid-phase synthesis of molecularly imprinted polymer nanoparticles with a reusable template—“Plastic antibodies”. *Adv Funct Mater*, 2013, 23: 2821–2827
- 55 Canfarotta F, Poma A, Guerreiro A, et al. Solid-phase synthesis of molecularly imprinted nanoparticles. *Nat Prot*, 2016, 11: 443
- 56 Ambrosini S, Beyazit S, Haupt K, et al. Solid-phase synthesis of molecularly imprinted nanoparticles for protein recognition. *Chem Commun*, 2013, 49: 6746–6748
- 57 Poma A, Guerreiro A, Caygill S, et al. Automatic reactor for solid-phase synthesis of molecularly imprinted polymeric nanoparticles

- (MIP NPs) in water. *RSC Adv*, 2014, 4: 4203–4206
- 58 Xu J, Ambrosini S, Tamahkar E, et al. Toward a universal method for preparing molecularly imprinted polymer nanoparticles with antibody-like affinity for proteins. *Biomacromolecules*, 2015, 17: 345–353
- 59 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
- 60 Xu J, Haupt K, Tse Sum Bui B. Core-shell molecularly imprinted polymer nanoparticles as synthetic antibodies in a sandwich fluoroimmunoassay for trypsin determination in human serum. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2017, 9: 24476–24483
- 61 Takeuchi T, Sunayama H, Takano E, et al. Post-imprinting and in-cavity functionalization. In: *Molecularly Imprinted Polymers in Biotechnology*. Berlin: Springer, 2015. 95–106
- 62 Suga Y, Sunayama H, Ooya T, et al. Molecularly imprinted polymers prepared using protein-conjugated cleavable monomers followed by site-specific post-imprinting introduction of fluorescent reporter molecules. *Chem Commun*, 2013, 49: 8450–8452
- 63 Sunayama H, Takeuchi T. Molecularly imprinted protein recognition cavities bearing exchangeable binding sites for post imprinting site-directed introduction of reporter molecules for readout of binding events. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2014, 6: 20003–20009
- 64 Sunayama H, Ooya T, Takeuchi T. Fluorescent protein-imprinted polymers capable of signal transduction of specific binding events prepared by a site-directed two-step post-imprinting modification. *Chem Commun*, 2014, 50: 1347–1349
- 65 Horikawa R, Sunayama H, Kitayama Y, et al. A programmable signaling molecular recognition nanocavity prepared by molecular imprinting and post-imprinting modifications. *Angew Chem Int Ed*, 2016, 55: 13023–13027
- 66 Zhao T, Wang J, He J, et al. One-step post-imprint modification achieve dual-function of glycoprotein fluorescent sensor by “Click Chemistry”. *Biosens Bioelectron*, 2017, 91: 756–761
- 67 Sulitzky C, Rückert B, Hall A J, et al. Grafting of molecularly imprinted polymer films on silica supports containing surface-bound free radical initiators. *Macromolecules*, 2002, 35: 79–91
- 68 Rick J, Chou T C. Using protein templates to direct the formation of thin-film polymer surfaces. *Biosens Bioelectron*, 2006, 22: 544–549
- 69 Xuan S, Wang Y X J, Yu J C, et al. Tuning the grain size and particle size of superparamagnetic Fe_3O_4 microparticles. *Chem Mater*, 2009, 21: 5079–5087
- 70 Yamaura M, Camilo R L, Sampaio L C, et al. Preparation and characterization of (3-aminopropyl) triethoxysilane-coated magnetite nanoparticles. *J Magn Magn Mater*, 2004, 279: 210–217
- 71 Rossetti R, Nakahara S, Brus L E. Quantum size effects in the redox potentials, resonance Raman spectra, and electronic spectra of CdS crystallites in aqueous solution. *J Chem Phys*, 1983, 79: 1086–1088
- 72 Alivisatos A P. Semiconductor clusters, nanocrystals, and quantum dots. *Science*, 1996, 271: 933–937
- 73 Michalet X, Pinaud F F, Bentolila L A, et al. Quantum dots for live cells, *in vivo* imaging, and diagnostics. *Science*, 2005, 307: 538–544
- 74 Rachkov A, Minoura N. Towards molecularly imprinted polymers selective to peptides and proteins. The epitope approach. *Bioch Biophys Acta*, 2001, 1544: 255–266
- 75 Cutivet A, Schembri C, Kovensky J, et al. Molecularly imprinted microgels as enzyme inhibitors. *J Am Chem Soc*, 2009, 131: 14699–14702
- 76 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
- 77 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
- 78 Piskiewicz S, Kirkbride E A, Doreng-Stearns N, et al. Molecularly-imprinted nanoparticles that recognize *Naja mossambica* cytotoxins: Binding studies and biological effects. *Chem Commun*, 2013, 49: 5954–5956
- 79 Bertolla M, Cenci L, Anesi A, et al. Solvent-responsive molecularly imprinted nanogels for targeted protein analysis in MALDI-TOF mass spectrometry. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2017, 9: 6908–6915
- 80 Liu Y, Fang S, Zhai J, et al. Construction of antibody-like nanoparticles for selective protein sequestration in living cells. *Nanoscale*, 2015, 7: 7162–7167
- 81 Wulff G. Fourty years of molecular imprinting in synthetic polymers: Origin, features and perspectives. *Microchim Acta*, 2013, 180: 1359–1370

Summary for “基于分子印迹的蛋白质识别及应用研究进展”

Molecular imprinting for protein recognition: Current status, challenges and applications

Yanting He, Jing Bai & Zi'an Lin*

Ministry of Education Key Laboratory of Analytical Science for Food Safety and Biology, College of Chemistry, Fuzhou University, Fuzhou 350116, China

* Corresponding author, E-mail: zianlin@fzu.edu.cn

Molecular recognition plays a critical role in numerous living systems. Over the past several decades, considerable attempts have been made to create synthetic recognition systems with high specificity and selectivity for a certain molecule by utilizing natural receptors such as antibodies, receptors, enzymes and aptamers. Despite their high selectivity and broad range of applications, these biomolecules always suffer from some drawbacks, for example, instability in harsh condition, high production cost. In response to these limitations, the alternative molecular imprinting technique has attracted a number of researchers' sustain interests, shows a promising potential in the creation of synthetic recognition systems.

Molecular imprinting, a synthetic “Lock to Key” technique that uses molecular templates to create selective binding sites in cross-linked polymers, has become one of the most efficient methods for preparation of selective recognition materials. To date, a wide range sizes of template including inorganic ions, drugs, nucleic acids, peptides, proteins, viruses, and whole cells have been extensively applied in the synthesis of various specific molecularly imprinted polymers. Among them, the majority of the publications and successful applications in molecular imprinting are aimed at recognition and separation of small molecules. Molecular imprinting of biomacromolecules, especially proteins, still remains great challenges. Due to its large size, environmentally instability, chemical and structural complexity, traditional imprinting methods were limited and not suitable for proteins.

Since 2011, protein imprinting has achieved some significant breakthroughs in imprinting methods and applications. On one hand, some novel and special protein imprinting methods have been developed, such as nanomaterial-based imprinting, boronate affinity-based surface imprinting, epitope imprinting, solid-phase synthesis and post-imprinting modification. These newly emerging methods effectively solved some key issues in protein imprinting and were applied for synthesis of MIPs with special properties that were not well demonstrated before. In this paper, we have analyzed the merits and problems of these methods in detail. On the other hand, based on the novel protein imprinting materials with special properties, some new advanced applications, such as disease diagnosis, proteomics and bioimaging, have well been demonstrated and showed great potentials.

In addition, the future challenges and opportunities in protein imprinting were also discussed. Despite the tremendous interest in protein imprinting, related research studies were still behind compared to the progress made in molecular imprinting of small molecules. Particularly, the design of universal protein imprinting materials with desirable properties still remains great challenges. As to future development, developing facile and versatile protein imprinting methods is still of significant importance. Meanwhile, as a multidisciplinary technology, protein imprinting should develop rapidly along with the advances in polymer technology, nanotechnology, analytical chemistry, biotechnology and so on. We foresee that, in a long period of time, creating new protein imprinting strategies, developing desirable protein imprinting materials with special properties based on borrowing and integration of related technologies/strategies, and thereby enable potential important applications are still the main direction of protein imprinting.

molecular imprinting, protein, molecular recognition, application

doi: 10.1360/N972018-00803