

·研究简报·

蛋白质分子印迹聚合物研究*

王 虹 黄 亮 孙 彦**
(天津大学化工学院生物化工系 天津 300072)

关键词 分子印迹, 蛋白质, 吸附, 分子识别

分子识别现象在生命过程中扮演着极其重要的角色,对此进行研究和探索是化学和生物学领域的核心课题^[1],制备具有分子识别能力的人工受体是对该领域科学工作者的一个持久挑战^[2-4].为此,相关研究人员进行了多方努力,创造性地发展了许多崭新的方法和手段,其中的分子印迹聚合物制备技术就是这些方法和手段中的一种^[5-8].

从已发表的文献上看,以往比较成熟的印迹研究工作主要集中在一些构象简单的小分子上^[9-13];而对大分子,尤其是水溶性生物大分子,因存在着体积庞大、结构复杂、可结合位点多以及容易变性失活等因素,按照常规的方法对其进行印迹研究一直相当困难^[14-17],许多合成和应用方面的实际问题还亟待解决.本文对此进行了探索,并以丙烯酸(AA)、甲基丙烯酸(MAA)以及甲基丙烯酸β-羟乙酯(HEMA)为单体,乙二醇双甲基丙烯酸酯(EDMA)为交联剂,牛血清白蛋白(BSA)为印迹分子,制备了表 1 所示的 3 种对印迹蛋白具有预期识别效果的蛋白质分子印迹聚合物.

将 BSA 溶于去离子水中,再依次加入单体、交联剂和光引发剂安息香乙醚(BEE);待混合均匀后,于 4℃下静置过夜,使印迹分子与单体充分作用;然后将其转移至冰浴冷却下的培养皿中,通过 30 cm 外、10 min 紫外光照引发聚合反应制备 BSA 分子印迹聚合物.得到的坚硬、微黄透明状的整块聚合物经粉碎后于 500 r/min 球磨机中研磨 30 min,再以电动筛分机自动选取 20~40 μm 间的颗粒;然后将其用 50%(V/V)乙醇-水溶液反复漂洗、离心沉降,以除去其中细小粉末;得到的聚合物再用含有 10%(W/V)十二烷基硫酸钠(SDS)的 0.05 mol/mL NaOH 溶液反复洗涤除去印迹分子;经大量去离子水洗至中性并静置 24 h 后,4000 r/min 离心 30 min,取上清液,用紫外-可见分光光度计在波长 280 nm 处测其吸光度,直至检测不到印迹蛋白的特征吸收为止.用无水乙醇于索氏提取器中抽提 24 h,以除去少量未反应的有机物,并以去离子水将粒子洗至中性后真空抽干.不加印迹蛋白的空白聚合物采用相同的方法制得,其组成配比与表 1 中的 Polymer 1 相同.

Table 1 Protein imprinted polymer compositions

Polymer	Template (g)	Functional Monomer (mL)	Cross-linker (mL)	Photo-initiator (g)	Solvent (mL)
1	BSA (0.2000)	AA (2.0)	EDMA (1.0)	BEE (0.05)	H ₂ O (0.5)
2	BSA (0.1583)	AA (1.0), MAA (1.0)	EDMA (1.0)	BEE (0.05)	H ₂ O (0.5)
3	BSA (0.1405)	AA (1.0), HEMA (1.0)	EDMA (1.0)	BEE (0.05)	H ₂ O (0.5)

实验中发现,在 BSA 加入量确定的情况下,单体的加入比例对形成一个相溶性良好的均一预聚体系有着明显的影响.其中,AA 可以在较大的范围内与蛋白质-水体系互溶;而 MAA 及 HEMA 则只能部分地与蛋白质-水-AA 体系互溶,当单体

加入量超过一定的限度时,原来溶解的印迹蛋白分子从体系中析出.因此,蛋白质-水-AA-MAA 或是 HEMA 之间的溶解平衡只能在一定的范围内保持稳定,超出了这个范围,此平衡即被打破.

研究显示,交联剂的加入次序、多少和速度对

* 2003-11-17 收稿,2003-12-18 修稿;国家杰出青年科学基金(基金号 20025617)资助项目; ** 通讯联系人

蛋白质在预聚体系中的溶解性能有着决定性的影响;当交联剂先于单体加入、加入过快或加入量超过一定比例时,原已溶解的蛋白质会立即从溶液中不可逆析出,整个多元混溶的澄清溶液变为浑浊,导致各组分间的脆弱溶解平衡瞬间瓦解.因此,为了防止印迹蛋白的析出,本文采取在连续搅拌下逐渐滴加的方式,在 2.0 h 里,缓缓地向前聚体系中加入交联剂,确保整个体系在滴加过程中始终处于良好的溶解平衡状态.

由于聚合物的吸附行为可以反映所选蛋白质的印迹效果,本文对印迹聚合物和空白聚合物的吸附性能进行了对比考察.首先以 pH 7.0 的 0.01 mol/mL Tris-HCl 缓冲液配制了一系列不同浓度的 BSA 溶液,分别测定其吸光度,作标准曲线;然后以同样缓冲液分别配制浓度为 0.1 ~ 2.0 mg/mL 的 BSA 溶液若干份,每份 25 mL;将其倒入锥形瓶中,加入 0.1 g 的聚合物颗粒.在室温下于摇床中匀速摇动 24 h 后,取出部分溶液置于离心管中以 4000 r/min 的转速离心 30 min;最后以紫外-可见分光光度计测定上清液的吸光度,通过标准曲线读出吸附前后的蛋白质浓度变化值,由下式计算平衡吸附量:

$$q = \frac{(c_1 - c_2)V}{W} \quad (1)$$

式中 q 为蛋白质的吸附量(mg/g), c_1 和 c_2 分别为吸附前、后的蛋白质浓度(mg/mL), V 为蛋白质溶液的体积(mL), W 为吸附剂的质量(g).

吸附数据以最小二乘法、Langmuir 单分子层吸附模型进行拟合:

$$q = \frac{q_m \cdot c}{K_d + c} \quad (2)$$

式中 q 为平衡吸附量(mg/g), q_m 为饱和吸附量(mg/g), K_d 为解离常数(mg/mL), c 为蛋白质平衡浓度(mg/mL).

图 1 为聚合物对 BSA 的吸附情况.从中可以看到,在给定的实验条件下,与空白聚合物相比,由于具有与印迹蛋白分子大小相同、形状互补的孔穴以及对应排列的功能基团,所有印迹过的聚合物对 BSA 都显示出了较高的平衡吸附量,其吸附数据可用 Langmuir 单分子层吸附模型进行相应的拟合.其中, Polymer 1 对 BSA 的吸附量最大,其最高平衡吸附量达到了 80.27 mg/g,而同样组成的空白聚合物则仅为 49.33 mg/g.由此可见,通过对聚合物的配方组成、试剂的加样次序以及制备

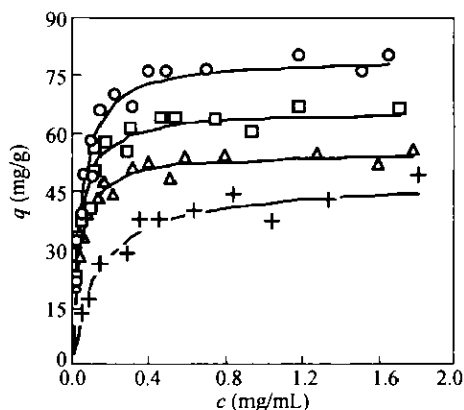


Fig. 1 Adsorption isotherms of polymer 1, 2, 3 and BP to BSA

- Fitted curve

○ Polymer 1, $q_m = 79.48$ mg/g, $K_d = 0.0377$

□ Polymer 2, $q_m = 65.81$ mg/g, $K_d = 0.0332$

△ Polymer 3, $q_m = 54.80$ mg/g, $K_d = 0.0340$

+ BP, $q_m = 47.25$ mg/g, $K_d = 0.1315$

条件进行仔细的调控,采用本实验所确定的光聚合体系,可以有效地避免加热过程对蛋白质三维结构的影响、方便地对水溶性大分子蛋白质进行印迹,印迹过的聚合物表面对印迹分子的形状有着预期的“记忆能力”.

图中所示 Polymer 2 和 Polymer 3 对 BSA 的吸附量要小于 Polymer 1,说明印迹聚合物的组成对其吸附行为有着明显的影响.本文曾尝试在不改变其它试剂用量的前提下,将 Polymer 1 中所用的单体 AA 全部替换成与其性质相似的衍生物 MAA 或 HEMA,结果发现原已完全溶解的蛋白质 BSA 又重新从溶液中沉淀析出,无法获得合格的预聚物溶液,因此只得改为部分加入 MAA 或 HEMA 来制备由两种单体组成的共聚物.从表 1 中各配方的试剂比例可以看出,将 AA 的用量减少一半以后 (Polymer 2 和 Polymer 3),如果选择等体积地加入另外一种单体,比如 MAA 或 HEMA,同样可以制备得到相应的 BSA 印迹聚合物.但是,由于 MAA 和 HEMA 与水-蛋白体系的互溶性要差于 AA,所以印迹蛋白的加入比例要相应减少.

观察图 1 中 Polymer 2、Polymer 3 的吸附可以发现,随着水溶性较差单体 MAA 和 HEMA 的加入,印迹聚合物对印迹蛋白分子依然表现出了一定的识别能力和亲和性,但其吸附量则有了程度不同的下降,在数值上不如只由一种单体 AA 制备的 Polymer 1.从所用几种丙烯酸衍生物的化学结构可以推断,图中各吸附量的大小次序,其实是

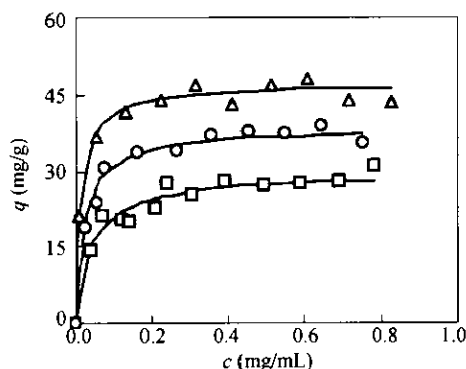


Fig. 2 Adsorption isotherms of polymer 1 to Hb, Lys and OVA

- Fitted curve

△ Polymer 1 to Hb, $q_m = 46.42 \text{ mg/g}$, $K_d = 0.0145$

○ Polymer 1 to Lys, $q_m = 38.44 \text{ mg/g}$, $K_d = 0.0251$

□ Polymer 1 to OVA, $q_m = 29.57 \text{ mg/g}$, $K_d = 0.0428$

这几种单体亲水性强弱的一种间接反映.按照 HEMA、MAA 和 AA 的顺序,其亲水性能在逐渐增强,与蛋白质-水体系变得更为相容,因而可以允许较多的印迹蛋白溶解其中,从而形成更多具有

识别能力的作用点位.因此在吸附作用发生时,经过印迹的聚合物可以吸附较多的印迹蛋白,最终表现出更大的吸附量.

印迹聚合物对印迹分子和非印迹分子的不同吸附表现是其具有选择性的重要标志,本文为此选择了 3 种非印迹蛋白分子作为对比研究之用.图 2 所示即为经 BSA 印迹的 Polymer 1 对 3 种非印迹分子牛血红蛋白(Hb)、溶菌酶(Lys)和卵清蛋白(OVA)的吸附等温线.从中不难看出, Polymer 1 对这 3 种蛋白分子均有一定的吸附能力,其中对 Hb 的吸附量最大, Lys 次之, OVA 最小,但 3 者的吸附值均要小于经过印迹的 Polymer 1、2 和 3 在图 1 中对印迹蛋白 BSA 的吸附,而与没有经过印迹的 BP 的吸附量相近.因此,从吸附量上看, Polymer 1 对几种不同蛋白分子的吸附表现是不一样的,其对印迹蛋白分子 BSA 的确显示出了较高的亲和能力,而对非印迹蛋白 Hb、Lys 和 OVA 的吸附表现,则可归属于一般吸附剂常见的非特异性吸附.

REFERENCES

- Lehn J M. *Angew Chem Int Ed Engl*, 1988, 27: 89 ~ 104
- Cram D J. *Angew Chem Int Ed Engl*, 1988, 27: 1009 ~ 1020
- Chen L R(陈丽蓉), Zhong H(钟炫), Jia X R(贾欣茹), Qin Y(秦洋), Liao Q(廖清), Li M Q(李明谦), Wei Y(危岩). *Acta Polymer Sinica(高分子学报)*, 2001(4): 553 ~ 555
- Yu Y H(余艺华), Xue B(薛博), Sun Y(孙彦), He B L(何炳林). *Acta Polymer Sinica(高分子学报)*, 2000(3): 340 ~ 344
- Wulff G. *Trends Biotechnol*, 1993, 11: 85 ~ 87
- Ekberg B, Mosbach K. *Trends Biotechnol*, 1989, 7: 92 ~ 96
- Mosbach K. *Trends Biochem Sci*, 1994, 19: 9 ~ 14
- Wulff G. *Angew Chem Int Ed Engl*, 1995, 34: 1812 ~ 1832
- Wulff G, Sarhan A. *Angew Chem Int Ed Engl*, 1972, 11: 341 ~ 344
- Andersson L I, Mosbach K. *J Chromatogr A*, 1990, 516: 313 ~ 322
- Vlatakis G, Andersson L I, Müller R, Mosbach K. *Nature*, 1993, 361: 645 ~ 647
- Shea K J, Spivak D A, Sellergren B. *J Am Chem Soc*, 1993, 115: 3368 ~ 3369
- Quaglia M, Chenon K, Hall A J, Lorenzi E D, Sellergren B. *J Am Chem Soc*, 2001, 123: 2146 ~ 2154
- Liao J L, Wang Y, Hjertén S. *Chromatographia*, 1996, 42: 259 ~ 262
- Hjertén S, Liao J L, Nakazato K, Wang Y, Zamaratskaia G, Zhang H X. *Chromatographia*, 1997, 44: 227 ~ 234
- Aherne A, Alexander C, Payne M J, Perez N, Vulfson E N. *J Am Chem Soc*, 1996, 118: 8771 ~ 8772
- Shi H, Tsai W B, Garrison M D, Ferrari S, Ratner B D. *Nature*, 1999, 398: 593 ~ 597

STUDIES ON PROTEIN IMPRINTED POLYMERS

WANG Hong, HUANG Liang, SUN Yan

(*Department of Biochemical Engineering, School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072*)

Abstract Molecularly imprinted polymers (MIPs) were prepared by using acrylic derivatives as the functional monomers, ethylene glycol dimethacrylate (EDMA) as the cross-linker, bovine serum albumin (BSA) as the template. In order to obtain qualified protein imprinted polymers, detailed studies were carried out over the polymer compositions, chemical reagent adding sequence, UV radiation time and synthetic conditions. The experimental data showed that the BSA imprinted polymers, compared to their blank counterpart, exhibited desired adsorption affinities and selectivity to the BSA molecule, and the amounts of adsorption were obviously higher than that of the blank polymer.

Key words Molecular imprinting, Protein, Adsorption, Molecular recognition