

人血红蛋白分子印迹聚合物的制备及分子识别性能

孙瑞丰, 罗晖, 于慧敏, 沈忠耀

(清华大学化工系, 北京 100084)

摘要: 以丙烯酰胺和甲基丙烯酸为功能单体制备得到了具有选择性识别能力的人血红蛋白分子印迹聚合物. 该印迹聚合物的分子识别特性来自聚合物的结合基团与印迹分子的功能基团之间的氢键和静电作用, 以及印迹孔穴的空间几何选择性. 研究表明, 聚合单体中甲基丙烯酸的含量会影响聚合物对血红蛋白的特异结合能力及分子印迹聚合物的吸附容量和洗脱性能.

关键词: 丙烯酰胺; 甲基丙烯酸; 人血红蛋白; 分子印迹聚合物; 分子识别

中图分类号: O657.32 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-606X(2005)03-0341-04

1 前言

分子印迹技术是一种人工合成对特定目标分子具有高度亲和性的高分子聚合物的技术. 在聚合过程中, 印迹分子通过氢键、静电作用、疏水作用等非共价键作用, 对可聚合的功能单体进行组装, 然后除去印迹分子, 在聚合物中留下了功能基团精确排布的孔穴, 该孔穴与印迹分子的形状、大小、电荷分布具有互补性, 因而这种聚合物具有选择性识别印迹分子的功能.

目前, 分子印迹技术已成功用于氨基酸类、糖类及其衍生物和药物类手性物质的分离^[1-3], 但对生物大分子, 如蛋白质的印迹技术研究还较少有成功的范例^[4,5]. 相对于小分子的印迹, 生物大分子印迹技术存在着诸多困难: (1) 由于生物大分子的结构复杂, 与功能单体的可结合位点众多, 造成功能单体的选择十分困难; (2) 生物大分子的巨大体积使其在分子印迹聚合物中的传质较差, 造成印迹分子的解吸和洗脱十分困难, 并且使大分子的分子印迹聚合物的吸附容量很小; (3) 由于生物大分子在许多条件下容易变性失活, 引起空间结构的改变而使分子识别受到破坏, 因此其印迹聚合物的制备及操作条件必须十分温和, 包括溶剂、聚合温度等条件的选择都受到很大限制, 等等. 因此, 采用多种水溶性的功能单体制备蛋白质分子印迹聚合物可能是一种较好的选择^[5-7].

本研究以人血红蛋白为印迹分子, 采用丙烯酰胺和甲基丙烯酸为功能单体, 成功制备了对人血红蛋白具有较高选择性的分子印迹聚合物, 对生物大分子的印迹技术作了初步探索.

2 实验

2.1 仪器与试剂

人血红蛋白(HHb), 溶菌酶(Lysase), 牛血清白蛋

白(BSA), 华美生物工程公司; 甲基丙烯酸(MAA), 分析纯, 天津化学试剂六厂分厂, 使用前用活性炭吸附除去阻聚剂; 丙烯酰胺, 分析纯, 北京化学试剂公司; N,N'-亚甲基双丙烯酰胺, 分析纯, 北京化学试剂公司; 四甲基乙二胺(TEMED), 中国科学院上海生物化学研究所; 其余试剂均为分析纯.

ÅKTA explorer 型液相色谱仪, Agilent 8453 型紫外-可见光分光光度计.

2.2 分子印迹聚合物的制备

以丙烯酰胺和甲基丙烯酸为功能单体, 以人血红蛋白为印迹分子, 制备分子印迹聚合物(MIPs). 称取一定量的丙烯酰胺和甲基丙烯酸, 使丙烯酰胺和甲基丙烯酸的总量为 3 mmol, 加入 N,N'-亚甲基双丙烯酰胺 36 mg, 加入 3 mL 溶有 5 mg/mL 人血红蛋白和 0.2 mg/mL 过硫酸铵的磷酸盐缓冲液(0.01 mol/L, pH 6.2), 超声波处理 10 min 后加入 TEMED 90 μ L 进行聚合. 空白聚合物的制备方法同上, 只是在聚合时未加入印迹分子.

将聚合好的 MIPs 挤过 60 目筛网, 使其破碎成颗粒. 将颗粒转移到锥形瓶中, 加入 0.01 mol/L, pH 7.0 的磷酸盐缓冲液 100 mL, 25 $^{\circ}$ C 下置于 195 r/min 的摇床上振荡. 定时取样, 测定溶液中蛋白质的含量, 直至确认未印迹蛋白已洗脱干净. 为了洗脱印迹的蛋白质, 用含 10 g/L 十二烷基磺酸钠(SDS)的 10%(ϕ) HAc 溶液处理 2 h, 然后用去离子水反复冲洗. 洗脱后的 MIPs 用磷酸缓冲液反复洗涤、离心.

2.3 分子印迹聚合物的吸附性能

在制备好的 MIPs 中加入 0.5 mg/mL 的人血红蛋白溶液 5 mL, 25 $^{\circ}$ C 下振荡 1 h, 用考马斯亮蓝法测定上清液中蛋白含量. 用同样的方法测定空白聚合物对人血红蛋白的吸附.

将待吸附样品换成牛血清白蛋白溶液(溶解于 pH

4.6 的磷酸缓冲液中), 用同样的方法测定 MIPs 对非印迹蛋白的吸附性能。

2.4 分子印迹聚合物的色谱评价

将洗脱印迹分子后的 MIPs 装入改造的 2.5 mL 塑料注射器内, 接上 ÄKTA explorer 液相色谱仪, 对印迹蛋白质进行色谱评价. 上样量为 100 μ L(蛋白质浓度为 1 mg/mL), 流动相为 0.01 mol/L 的磷酸盐缓冲液(pH 7.0), 流速 0.1 mL/min, 用 220 nm 波长紫外检测流出液中的蛋白质。

2.5 光谱法分析功能单体与印迹分子的相互作用

在 0.01 mol/L 的磷酸盐缓冲溶液中(pH 6.2), 固定人血红蛋白的浓度(0.2 mg/mL), 渐增丙烯酰胺或甲基丙烯酸酯的量, 配制成系列溶液, 以对应的丙烯酰胺或甲基丙烯酸空白溶液为参比, 扫描这些溶液在 190~800 nm 的吸收光谱, 以观测功能单体与印迹分子的相互作用。

3 结果与讨论

3.1 人血红蛋白分子印迹聚合物的制备

考察了印迹蛋白质相对用量对 MIPs 制备的影响, 发现对于聚丙烯酰胺类的 MIPs, 未被印迹的蛋白质比率随印迹蛋白质用量的加大而降低, 但最低只能达到约 50% 左右, 如图 1 所示. 尽管加大印迹蛋白质的用量

在一定程度上可以增加 MIPs 的印迹量, 但同时也会造成印迹分子的大量损失, 并增大印迹分子的扩散阻力。

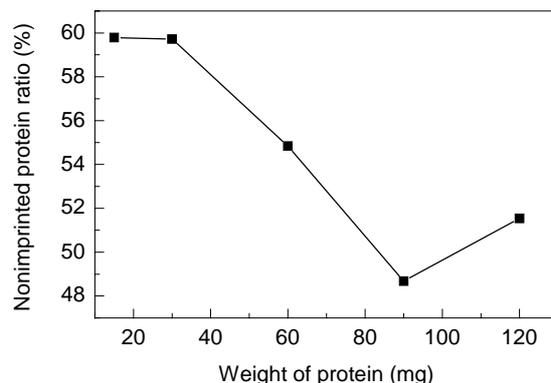


图 1 印迹蛋白质用量与未印迹比率的关系
Fig.1 The relationship between weight of protein for imprinting and non-imprinted ratio of protein

3.2 人血红蛋白分子印迹聚合物的色谱评价

进一步对 HHb-MIPs 的吸附特异性进行液相色谱评价. 由图 2 可见, HHb-MIPs 对印迹分子 HHb 具有一定的吸附量. MIPs 中 HHb 分子的解吸不彻底, 原因可能是较大分子量的 HHb 在 MIPs 中的结合位点比较多, 而 HHb-MIPs 对非印迹蛋白溶菌酶基本无吸附, 即人血红蛋白的 MIPs 对其他蛋白质的非特异性吸附很小。

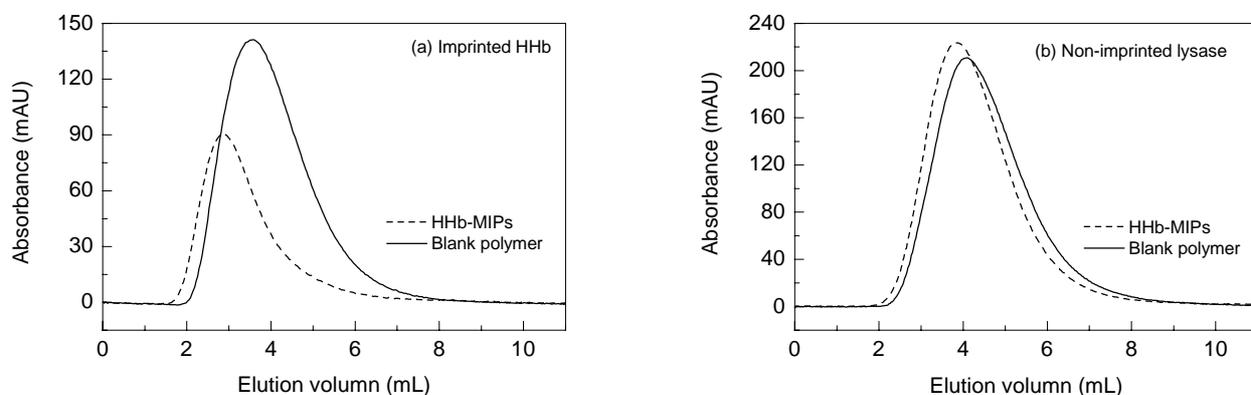


图 2 HHb-MIPs 及空白聚合物对印迹的 HHb 和未印迹的蛋白溶菌酶的色谱图
Fig.2 Liquid chromatography of HHb-MIPs and blank polymer for imprinted HHb and non-imprinted lysase

3.3 印迹分子与功能单体的相互作用

由于大多数功能单体都需在有机溶剂中发生聚合, 而有机溶剂易导致蛋白质分子结构变性. 为此, 采用能在水溶液中聚合的功能单体(丙烯酰胺、甲基丙烯酸)制备 HHb 的 MIPs, 并用紫外滴定法研究了溶液中功能单体与印迹分子 HHb 的相互作用。

按前述方法, 在印迹分子血红蛋白溶液中改变功能单体(丙烯酰胺或甲基丙烯酸)浓度, 得到一系列溶液的

吸收光谱. 随功能单体浓度的变化, HHb 的吸收光谱发生了变化, 这表明在人血红蛋白和功能单体之间产生了相互作用. 由于丙烯酰胺在水中是非解离的, 其酰胺基团能在水中形成氢键^[8], 因此推测该结合作用是血红蛋白与丙烯酰胺的酰胺基之间形成的氢键作用. 而 MAA 的羧基能在水中形成氢键^[8], 且 HHb 和 MAA 在 pH 6.2 的磷酸盐缓冲液中带不同电荷, 因此 HHb 和 MAA 之间存在的可能是较强的静电作用和氢键的协同作用。

功能单体的种类和浓度对制备 MIPs 非常关键,会影响对印迹分子的洗脱、在聚合物中的传质及 MIPs 的吸附容量. 由于 MAA 与血红蛋白之间存在较强的静电作用,添加 MAA 可加大 MIPs 的吸附容量,但同时也会使 MIPs 的非特异性结合增加. 因此需对 MIPs 中 MAA 的添加量进行考察.

3.4 分子印迹聚合物对人血红蛋白的特异性吸附性能

考察了不同 MAA 含量的 HHb-MIPs 的特异性吸附性能,研究对象分别为 HHb 及分子量相近(67000 Da)的非印迹蛋白-牛血清白蛋白(BSA),结果如图 3 所示.

由图 3(a)可见, HHb-MIPs 对非印迹蛋白质 BSA

的结合量与空白聚合物的结合量几乎一致,说明 HHb-MIPs 对 BSA 没有特异性的识别能力. 而 HHb-MIPs 对印迹分子 HHb 的吸附量与空白聚合物有一定的差别,说明 HHb 的分子印迹聚合物对 HHb 具有特异性吸附能力[图 3(b)]. 由于聚丙烯酰胺是一种惰性凝胶,不含 MAA 的空白聚合物对 HHb 几乎没有吸附,但不含 MAA 的 MIPs 对 HHb 则有一定的吸附. 这是由于在 MIPs 中有与 HHb 匹配的空间结构,可以利用空间效应吸附一定的印迹分子. 随着 MAA 含量的增加, MIPs 和空白聚合物对人血红蛋白的吸附量都增加,这表明 MIPs 的吸附容量主要取决于 MAA 的含量.

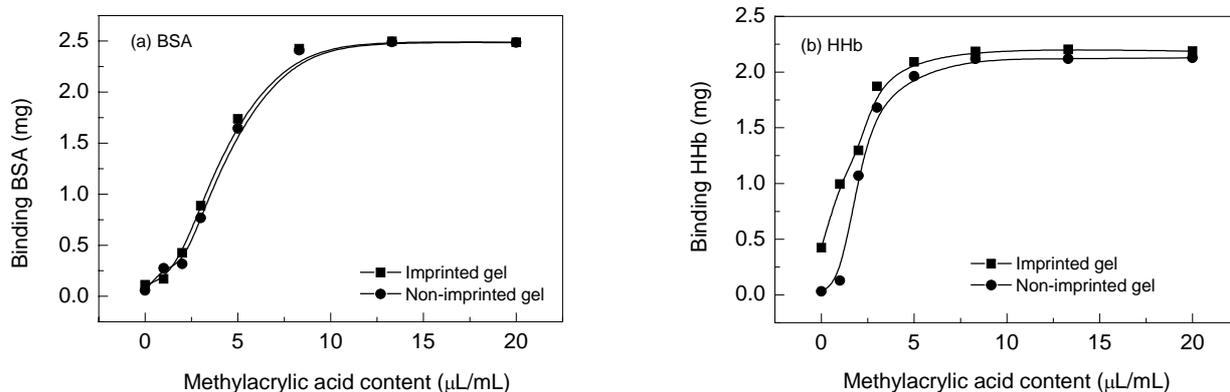


图3 不同 MAA 含量的 HHb-MIPs 对 BSA 和 HHb 吸附性能的比较

Fig.3 Binding comparison of MIPs for bovine serum albumin (BSA) and HHb at different contents of MAA

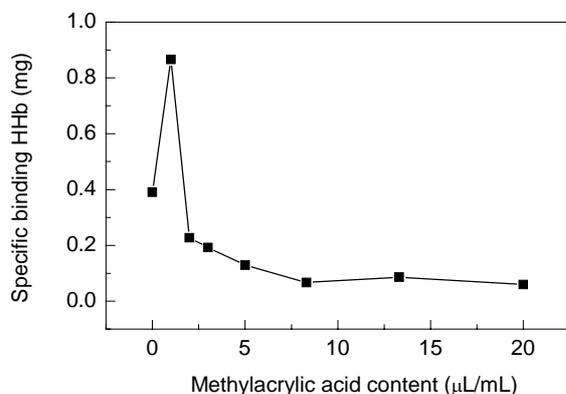


图4 HHb-MIPs 中 MMA 含量对特异性吸附的影响

Fig.4 Effect of MAA content on specific binding rate of HHb-MIPs

定义 MIPs 的特异吸附量(mg)为印迹胶吸附量与非印迹胶吸附量之差,考察 MAA 加入量与 MIPs 特异性吸附性能的关系,结果如图 4 所示. 当 MAA 含量较低时, MIPs 对人血红蛋白具有较高的特异性吸附,但当 MAA 的加入量由 1 μL 增至 2 μL 时,特异性突然下降. 进一步增加 MAA 的加入量, MIPs 的特异性吸附变得更不明显. 这说明 MAA 较强的静电作用会加大聚合物的非特异性吸附,使印迹蛋白质的模板作用表现得不明显.

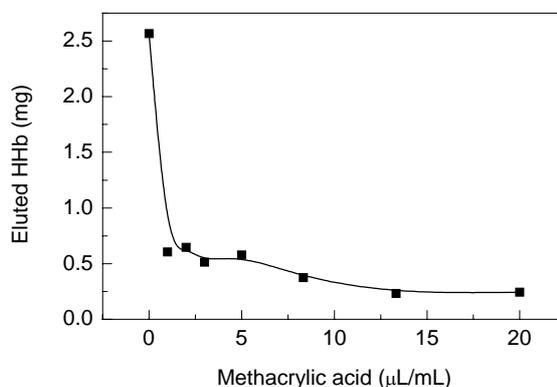


图5 HHb-MIPs 中 MAA 含量对洗脱的影响

Fig.5 Effect of MAA content on elution capacity of HHb-MIPs

3.5 甲基丙烯酸含量对印迹蛋白洗脱的影响

在蛋白质分子印迹技术的研究中,为了洗脱印迹的蛋白质分子,常常不得不采用蛋白酶降解或其他苛刻的方法,因此无法得到有活性的蛋白质^[7,9].

为了将蛋白质 MIPs 用于分离有活性的蛋白质,采用增加离子强度的方法进行印迹蛋白的洗脱. 由图 5 可见,随着 MIPs 中 MAA 含量的增加,采用高离子强度的 NaCl 溶液(0.5 mol/L)对印迹蛋白的洗脱量逐渐减少,

说明 MAA 含量增加, 使 MIPs 与印迹蛋白之间的相互作用(主要是静电作用)增强, 仅用高离子强度的溶液进行印迹蛋白的洗脱就比较困难. 此外, 由于蛋白质分子体积很大, MIPs 中的传质问题也可能是导致洗脱效果不理想的一个重要原因.

尽管高离子强度溶液的洗脱效果不显著, 但经多次重复吸附和洗脱实验的结果表明, 人血红蛋白的 MIPs 对印迹分子 HHb 的特异性识别能力保持不变, 可以多次重复使用.

4 结论

用丙烯酰胺和甲基丙烯酸为功能单体制备得到了具有一定选择性识别能力和较好吸附性能的人血红蛋白印迹聚合物. 该分子印迹聚合物的分子识别特性来自该聚合物的结合基团与印迹分子功能基之间的氢键和静电作用及印迹孔穴的几何选择性. 聚合单体中甲基丙烯酸的含量会同时影响聚合物对血红蛋白的吸附容量、特异结合能力和洗脱能力. 为了使洗脱的印迹蛋白质保持生物活性, 可考虑采用高离子强度溶液进行印迹分子解吸和洗脱, 此方面尚需进一步研究.

参考文献:

[1] Wulff G. Molecular Imprinting in Cross-linked Materials with the Aid

of Molecular Templates—A Way towards Artificial Antibodies [J]. *Angew. Chemie Int. Ed.*, 1995, 34(17): 1812–1832.

[2] Mosbach K, Ramstrom O. The Emerging Technique of Molecular Imprinting and Its Future Impact on Biotechnology [J]. *Bio/Technol.*, 1996, 14 (2): 163–170.

[3] 隋洪艳, 李红旗, 沈忠耀. 分子印迹技术—一种新型的亲和分离技术 [J]. *化工进展*, 2000, 19(5): 43–46.

[4] Shi H Q, Tsai W B, Garrison M D, et al. Template-imprinted Nanostructured Surfaces for Protein Recognition [J]. *Nature*, 1999, 398: 593–597.

[5] Hirayama K, Burow M, Morikawa Y, et al. Synthesis of Polymer-coated Silica Particles with Specific Recognition Sites for Glucose Oxidase by the Molecular Imprinting Technique [J]. *Chem. Lett.*, 1998, 8: 731–732.

[6] 郭洪声, 何锡文, 邓昌辉, 等. 药物扑热息痛分子模板聚合物的选择性富集与识别特性研究 [J]. *高等学校化学学报*, 2000, 21(3): 363–367.

[7] Liao J L, Wang Y, Hjerten S. Novel Support with Artificially Created Recognition for the Selective Removal of Proteins and for Affinity Chromatography [J]. *Chromatogr.*, 1996, 42: 259–262.

[8] Yu C, Mosbach K. Molecular Imprinting Utilizing an Amide Functional Group for Hydrogen Bonding Leading to Highly Efficient Polymers [J]. *J. Org. Chem.*, 1997, 62: 4057–4064.

[9] Venton D L, Gudipati E. Influence of Protein on Polysiloxane Polymer Formation: Evidence for Induction of Complementary Protein-polymer Interactions [J]. *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1250(2): 126–136.

Preparation and Specific Molecular Recognition Properties of Human Hemoglobin Imprinted Polymers

SUN Rui-feng, LUO Hui, YU Hui-min, SHEN Zhong-yao

(Department of Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: Using acrylamide and methylacrylic acid as functional monomers, human hemoglobin molecular-imprinting-polymers (HHb-MIPs) were successfully prepared. The studies showed that the specific molecular recognition properties of HHb-MIPs were related to both the interactions between the functional groups of polymers and imprinted protein, and geometric complementation of the cavities in the polymers. Further studies showed that the content of methylacrylic acid in the polymers could affect the specific binding properties of MIPs. The supplementation of methylacrylic acid can increase the specific adsorption capacity of the HHb-MIPs on the one hand, but decrease the elution capacity on the other hand.

Key words: acrylamide; methylacrylic acid; human hemoglobin; molecular imprinting polymers; molecular recognition