

分子印迹技术在多肽、蛋白质分离中的应用*

戴 勇

(盐城工学院 化学工程系, 江苏 盐城 224003)

摘 要: 介绍了分子印迹聚合物(Molecularly Imprinted Polymer, MIP)在分离生物大分子——多肽、蛋白质等领域中的应用进展, 及其发展前景。

关键词: 分子印记技术; 分子识别; 多肽; 蛋白

中图分类号: O631

文献标识码: A

文章编号: 1671-5322(2003)04-0046-04

分子印迹技术是利用受体-抗体作用机理, 结合生物化学、结构化学、材料化学等学科发展起来的新兴交叉学科。通过以特定分子为模板, 制备具有固定空穴大小和形状及特定排列功能基团的交联高聚物, 可实现对模板分子的选择性识别。

分子识别在生物活性方面发挥着重要作用, 大多数生物分离技术都依赖于分子识别作用。1973 年, Wulff 等利用酶和抗体具有分子形状、空间结构选择性的特点, 制备了对特定分子有特殊识别功能和高选择性材料的分子印迹聚合物并可用于色谱手性拆分的。

分子印迹技术的核心是制备分子印迹聚合物, 其制备原理为: (1) 在合成高分子前, 将待分离物质(即印迹分子、模板分子)加入能与之发生分子间作用的功能单体中, 形成复合物; (2) 然后通过加入交联剂、引发聚合反应, 形成高度交联的固态高分子, 把这种作用固定下来; (3) 接着利用化学或物理方法将印迹分子从高分子中移去。当印迹分子被除去后, 聚合物中就形成了与印迹分子空间匹配的具有多重作用位点的大量空穴, 且孔穴内各功能基团的位置与所用的模板分子互补, 可与模板分子发生特殊的结合作用, 从而实现模板分子的识别。如果模板分子可以反复洗脱和吸附, 则该分子印迹聚合物可以多次使用。如图 1 所示。

最近几年该技术应用研究十分活跃, 涉及的范围很广, 如氨基酸^[1]、糖类^[2]、金属离子^[3]、药物

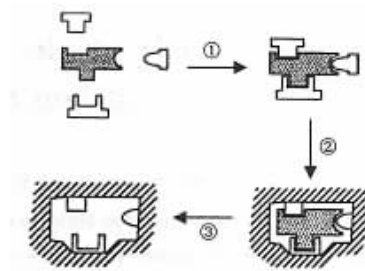


图 1 分子模板聚合物制备原理

Fig. 1 Schematic depiction of the preparation of molecular imprint

分子^[4]、除草剂^[5]等分析检测、分离与纯化。其中印迹聚合物最引人瞩目的应用领域是作为抗体和酶的模拟物, MIP 对目的物的专一结合性类似于抗体-抗原的结合特性。从应用的角度来看, 基于稳定、高效、高活性的分子识别的 MIP 是一种高效、低成本的途径, 以 MIP 为基础的亲和分离与利用抗体相比, 具有更好的物理和化学稳定性、机械稳定性和热稳定性。

1 分子印迹聚合物的应用

基于抗体-抗原反应的免疫分析以其高特异性和高灵敏度等特点, 已得到广泛应用。但是天然生物抗体由于缺乏保存和操作的稳定性, 在某些领域限制了它们的进一步应用。近年来出现的利用分子印迹技术制备的人工抗体由于具有类似生物抗体的高亲和性和高专一性, 同时又耐热、耐酸、耐碱且又可以长期稳定, 因此已引起人们的极

* 收稿日期: 2003-09-18

作者简介: 戴 勇(1975-), 男, 江苏建湖县人, 盐城工学院助教, 南京工业大学在读硕士研究生。

大兴趣^[6~7]。

朱庆枝^[8]利用分子印迹技术,制备了卵清白蛋白(EA)的人工抗体,研究了其对抗原的特异性吸附能力,在此基础上,模拟竞争型免疫反应,并建立了卵清白蛋白的仿生荧光免疫分析方法。

Maria Kempe^[9]以甲基丙烯酸为功能单体制备了 Z-D-Ala-Oly-D-Phe-Ome 的模板聚合物,其分离因子 α 为 1.84,经色谱分析能够与 Z-L-Ala-Oly-L-Phe-Ome 达到了基线分离。Nakazato^[10]等采用该法,以丙烯酰胺为功能单体合成了低交联度的凝胶,对血红蛋白、生长激素、红细胞色素、肌红蛋白和核糖核酸酶等进行了印迹。经过含 10% SDS 的乙酸(10%)溶液洗脱印迹分子,得到了具有良好选择性的 MIP,不同的印迹分子能被相应的凝胶所吸附,而非印迹蛋白质则不被这种惰性的凝胶所吸附。这种介质的特异性尤其显示在对两种空间结构相似的蛋白质(鲸鱼和马的肌红蛋白)的特异性吸附上。Nakazato 还对一种介质同时印迹若干种蛋白质,改善印迹聚合物的操作性能等进行了研究。Venton 等合成了印迹分子分别为脲酶和牛血清白蛋白的聚硅氧烷聚合物,印迹蛋白分子用链霉菌蛋白酶降解。

理论上分子印迹技术可以制备任意种物质的模板聚合物,但目前分子印迹技术的应用领域还主要局限于氨基酸、染料、金属离子等小分子物质。对蛋白质等生物大分子的应用较少,且效果还不够理想。目前,最少有两个因素限制了分子印迹技术选择性识别生物大分子:模板聚合物微观结构学和印迹热力学。模板聚合物微观结构学的原理认为生物大分子不易进入 MIP 的印迹孔穴和从中洗脱出来。Wulff 认为当模板分子大小为 1~2 nm 时,MIP 中孔径应为 20~50 nm 才能保证亲和位点的可接近性和分子扩散的无障碍性。但生物大分子的分子较大,因而在 MIP 中的扩散阻力大,有效亲和力较少。二是从模板分子与功能单体的作用来看,若以共价键形式与蛋白质相互作用则会由于作用力较强易造成蛋白质的失活。在非共价作用中,氯仿、乙腈等有机溶剂有利于氢键和离子作用的加强。但蛋白质作为生物活性物质在有机溶剂中会失活,水相中作用力的减弱会导致选择性亲和作用的减弱。这一矛盾成为了分子印迹技术在生物大分子分离中应用的阻碍。

万方数据

2 表面印迹技术

尽管包埋印迹技术比较简单,但存在着不少弊端,如印迹分子利用率低,印迹分子不易洗脱,介质内部扩散阻力质使模板分子难以到达识别位点。而表面印迹法能很好地克服这些弊端。通常采用的表面印迹法是在微球载体表面进行修饰或涂层制备分子印迹聚合物材料的一种方法,其优点是利用载体的物化稳定性,通过对载体本身性能调节来适应应用的需要。而且得到的较均匀球形颗粒适用于各种操作,尤其是色谱操作。一个早期的蛋白质印迹是将糖蛋白转铁蛋白在溶液中与硼酸酯硅烷(boronatesilane)发生作用,然后在多孔硅胶颗粒上进行聚合。由于硼酸酯基团能与转铁蛋白上的硅铝酸发生可逆反应,因此硼酸酯硅烷与转铁蛋白的预结合使得硼酸酯基团能正确排列,因此保证了印迹位点对转铁蛋白的特异性。通过 HPLC 的检测,该聚合物对转铁蛋白显示了微弱的特异性。

目前发展较为成熟的表面印迹技术是利用金属离子与组氨酸之间的螯合作用分离带有组氨酸片段的多肽和蛋白质。Bradley^[11]利用丙烯酰胺为功能单体,于富水相中制备 MIP 分离含有组氨酸基多肽,并对比了采用 Ni²⁺、Cu²⁺、Zn²⁺ 不同金属离子对印迹效果的影响,实验结果表明 Ni²⁺ 对多肽分子的特异性识别作用最强,结果见表 1。

表 1 Ni²⁺ 对多肽分子的印迹效果

Table 1 Maximum Binding (μmol Bound/μmol Ni) of N-Terminal Histidine Peptides to MIP

peptide analyte	max binding (μmol bound/μmol Ni)
His-Ala	0.79
His-Phe	0.77
His-Ala-Phe	0.65
His-Ala-Ala-Ala-Ala	0.50
His-Phe-Ala-Ala-Ala	0.49

Joshi 等将合成的键联印迹分子的单体溶于苯中再溶胀至甲基丙烯酸缩水甘油酯大孔微球内将苯缓慢蒸发除去后聚合水解除去印迹分子得到的聚合物材料可对结构相似大小或形状不同的物质进行分离。由于载体具有较高的孔度和表面积因而选择表面印迹方法可以使底物较易接近活性点。这是表面印迹技术优于沉淀聚合的一个方面。除此之外这种方法还可以单独改变载体树脂的交联

度或对孔结构进行调整通过合成可以容易地得到小粒径及窄分布的载体这类材料应用于色谱柱中具有低压高流速的特点。

3 抗原决定基印迹技术

近年来表面印迹技术得到很大的发展。但遗憾的是,利用金属螯合作用的表面印迹技术只能应用于含有裸露组氨酸基的蛋白质,并且金属螯合作用的特异性识别作用不强。近年来,新发展的抗原决定基法是基于使用多肽或蛋白质序列中裸露的一个特异短肽(抗原决定部位)片段作为模板分子,利用它所合成的 MIP 也能有效识别整个多肽和蛋白。其作用原理如图 2 所示。

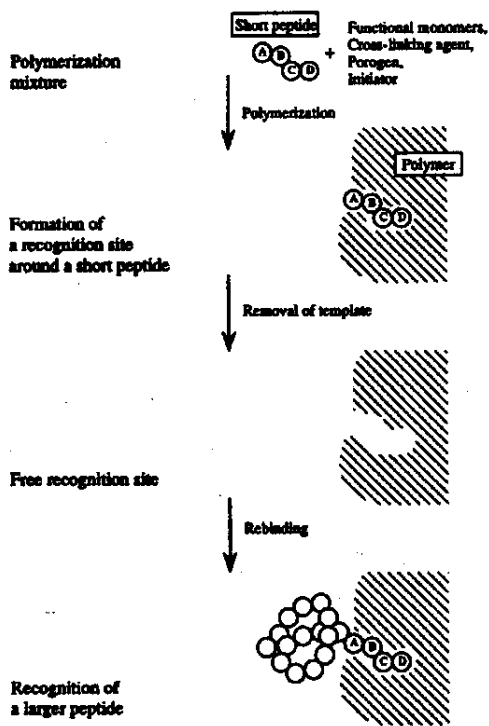


图 2 抗原决定基法示意图

Fig. 2 Schematic representation of the epitope approach

该方法将印迹生物大分子物质,简化为印迹小分子,降低了实验难度。抗原决定基印迹技术的关键在于对蛋白质三级结构的掌握和特异短肽片段的选取。

Alexandre 利用该方法分别,使用四肽 Tyr -

参考文献:

- [1] Han Seung Lee, Juan Hong. Chiral and electrokinetic separation of amino acids using polypyrrole-coated adsorbents[J]. J. Chromatography A, 2000, 868: 189-196.
- [2] Zhiliang Cheng, Erkang Wang. Capacitive detection of glucose using molecularly imprinted polymers[J]. Biosensors & Bioelectronics, 2001, 16: 179-185.

Pro - Leu - Gly, acetyl - L - tyrosine ethyl ester, 亮氨酸 - 脑啡肽 (YGGPL), Pro - Leu - Gly amide (PLG) 为模板分子制备了对脑下垂体叶下荷尔蒙有印迹效果的聚合物。通过固相萃取实验,证明以四肽 Tyr - Pro - Leu - Gly 为模板分子制备的 MIP 对所属蛋白具有较好的印迹效果 ($k' = 19.87, \alpha = 3.26$)。

Kazuya^[12] 以烷基咪唑为功能单体, N - α - t - boc - l - histidine 为模板分子在油包水乳液中制备了对胰蛋白水解酶具有印迹效果的模板聚合物,印迹聚合物与非印迹聚合物相比显示了较好促胰蛋白水解效能。

4 应用前景及存在的问题

在生物医药行业,1998 ~ 1999 年全世界 14 个主要市场的销售额达到了 2020 亿美元,其中包括重组蛋白质和单克隆抗体,而 MIP 作为吸附剂已经应用于蛋白质的分离,目前对于药物分子的纯手性化已经得到了比较广泛的认同,手性化合物的市场在 2005 年可能达到 2500 亿美元,几个制药公司也已经小规模地将 MIP 技术用于抗癌药物——紫杉醇的分离和纯化上。

尽管分子印迹技术发展很快,在固相萃取、抗体和受体模拟、生物传感器等领域得到了广泛的应用。但还存在着许多问题,首先功能单体的种类太少,不能满足某些分子识别的要求,目前通过分子模拟理论,根据模板分子的特点设计功能单体的研究报道还很少。其次,目前分子印迹反应大多是在有机相中进行,会导致蛋白质生物活性的丧失,如何能在水相进行分子印迹和识别仍是一大难题。

在 MIP 制备工艺上,一般情况下, MIP 首先制成块状,然后经过粉碎、筛选得到一定粒度分布的印迹颗粒,但颗粒的不规则性降低了模板聚合物的选择性和柱效,无法得到可用于制备分离级粒度可控印迹微球,限制了分子印迹技术的商业应用。这些问题促使对分子模板技术的研究进一步深入,以便获得更满意的制备技术。

- [3] 谭天伟,贺小进.壳聚糖金属离子印迹树脂的吸附模型[J].化工学报,2001,52(2):176-178.
- [4] 郭洪声,何锡文.药物氟哌酸分子模板聚合物的分子识别特性[J].分析化学研究报告,2001,29(2):128-132.
- [5] Matsui J,Kuniyuki F. Solid-phase extraction with a dibutylmelamine-imprinted polymer as triazine herbicide-selective sorbent[J]. J. Chromatography A,2000,889:25-31.
- [6] Kriz D,Mosbach K. Molecular imprinting-new possibilities for sensor technology[J]. J. Anal. Chem.,1997,69:345-349.
- [7] Haupt K,Mosbach K. Assay system for the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid using a molecularly imprinted polymer as an artificial[J]. J. Anal. Chem.,1998,70:628-631.
- [8] 朱庆枝,李顺华.仿生荧光免疫分析卵清白蛋白[J].福州大学学报,1999,27(9):116-117.
- [9] Kempe M,Glad M, Mosbach K. An approach towards surface imprinting using the enzyme ribonuclease[J]. J. Mol. Recogn., 1995,8:35-39.
- [10] Alexandre Rachkov,Norihiko Minoura.Towards molecularly imprinted polymers selective to peptides and proteins[J]. The epitope approach,Biochimica et Biophysica Acta,2001,1544:255-266.
- [11] Bradley R,Kenneth J. Molecular Imprinting for the Recognition of N-Terminal Histidine Peptides in Aqueous Solution[J]. Macromolecules,2002,35:6192-6201.
- [12] Kazuya Uezua,Masahiro Goto.A molecularly imprinted polymer that shows enzymatic activity[J]. Biochemical Engineering Journal 2003,14:85-91.

Research Advance of Molecular Imprinting Technique in the Peptides and Proteins

DAI Yong

(Department of Chemistry Engineering of Yancheng Institute of Technology,Jiangsu Yancheng 224003,China)

Abstract Molecularly imprinted technology is a rising cross-link technology on biochemistry, structure chemistry, material chemistry. Molecularly imprinted polymer processing functional groups and spatial cavities, are prepared by molecular template technique, template molecules can be selectively recognized. A review of their applications in peptides and proteins and practicable potentials was given.

Keywords Molecularly imprinted technology; molecular recognition; peptides; proteins