

分子印迹技术在生物大分子分离识别中的应用

郑超¹, 高如瑜¹, 张玉奎²

(1. 南开大学化学系, 天津 300071; 2. 中国科学院大连化学物理研究所, 辽宁 大连 116023)

摘要: 分子印迹技术是近些年发展起来的模拟抗体-抗原相互作用原理的新技术。该文介绍了分子印迹技术的产生和发展, 重点介绍了生物大分子印迹聚合物的制备条件、聚合方法及其识别机理, 并对该技术的应用前景及目前存在的问题进行了探讨。

关键词: 分子印迹; 分子识别; 生物大分子

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2006)03-0309-06 栏目类别: 专论与综述

Separation and Recognition of Biomacromolecule by Molecular Imprinting Technique

ZHENG Chao¹, GAO Ruyu¹, ZHANG Yukui²

(1. Department of Chemistry, Nankai University, Tianjin 300071, China; 2. Dalian Institute of Chemical Physics, the Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China)

Abstract: Molecular imprinting technique is a novel technique based on mimicking specific action of antibody-antigen. The emergence and the development of the technique are reviewed in this article. The focuses of this article include the introductions of the synthesis conditions, the comparisons of the various approaches on preparation methods as well as the recognition mechanisms of the biomacromolecule imprinted polymers. The primary synthetic methods include the embed technique, the surface imprinting procedure and the epitope approach. The epitope approach is based on using a short peptide as a template that represents only part of a larger peptide or protein, which in turn can be recognized by the synthesized polymer. This approach for the development of the biomacromolecule imprinted polymers selective to proteins is attractive from an economic viewpoint: a small peptide is usually less expensive, and the quantity necessary for the polymer preparation is more readily available than that of the corresponding protein. In the end, the limitations and the prospective applications of this biomacromolecular imprinted technique are also discussed.

Key words: molecular imprinting; molecular recognition; biomacromolecule

分子印迹技术^[1] (molecular imprinting technique, MIT) 的出现直接源于免疫学的发展。早在 20 世纪 30 年代, Breinl、Haurowitz 和 Mudd 就相继提出了一种当抗原侵入时生物体产生抗体的理论; 在 20 世纪 40 年代, 由著名的诺贝尔奖获得者 Pauling^[2] 对上述理论做了进一步阐释; 1949 年, Dickey^[3] 首先提出了“专一性吸附”这一概念, 这一概念实际上可以视为“分子印迹”的萌芽。1973 年, 德国 Heinrich Heine 大学的 Wulff 小组^[4] 首次报道人工合成了用于色谱手性拆分的分子印迹聚合物 (molecular imprinting polymer, MIP), 又称模板聚合物或特制聚合物。20 世纪 80 年代, Norrlof 等^[5] 进

一步发展了这一技术。1993 年瑞典大学的 Mosbach 等^[6] 发表了有关茶碱分子印迹聚合物的研究成果, 自此 MIT 得到了蓬勃的发展。

1997 年在瑞典的 Lund 大学成立了国际性的分子印迹协会 (Society for Molecular Imprinting, SIM)^[1], 其宗旨是“致力于分子印迹科学和技术的全面发展”。

分子印迹聚合物是以目标分子即烙印分子为模板, 选择与烙印分子具有结构互补的功能性聚合物单体分子, 这些单体分子与烙印分子结合形成复合物; 在交联剂作用下引发聚合, 使烙印分子周围形成交联度很高的三维交联的高分子聚合物网络; 然后

用洗脱液将烙印分子洗脱下来形成具有空腔的分子烙印聚合物。根据烙印分子与单体的相互作用,可把 MIP 的制备方法分为两种基本类型^[7-8]:共价法(预组织法)和非共价法(自组织法)。

MIT 之所以发展如此迅速,主要是因为它有三大特点:预定性(predetermination)、识别性(recognition)和实用性(practicability)。由于 MIPs 具有抗恶劣环境的能力,表现出高度的稳定性和长的使用寿命等优点,因此,对印迹聚合物的合成及其应用研究十分活跃,涉及的范围很广,如手性物质分离^[9-10]、生物传感器^[11-12]、模拟抗体与受体^[13-14]、酶模拟催化^[15-16]、氨基酸^[17-18]及多肽等生物大分子^[19-21]、金属离子^[22-23]、药物分子^[24-26]、除草剂^[27]等的分离与纯化。

由于 MIT 应用的范围十分宽广,因此,MIT 在生物大分子的应用领域具有广泛的应用前景,如对蛋白质^[28-29]、核酸^[21]和多糖^[30]的印迹,甚至对整个微生物细胞^[31]的印迹等等。

1 生物大分子印迹聚合物的制备

1.1 生物大分子印迹聚合物的制备条件

蛋白质是水溶性生物大分子,对其识别主要发生在水体系中,所以选择合适的单体使得到的 MIP 可以在水中识别蛋白质就显得尤为重要。目前,蛋白质分子印迹采用的单体有丙烯酸^[32-33]、甲基丙烯酸^[34]、丙烯酰胺^[35-36]、*N*-(4-乙烯苄基)亚胺基二乙酸铜(II)^[37]、2-乙烯基吡啶^[38]、4-乙烯基吡啶^[39]等。在实际应用中为了增加印迹分子与单体作用力的种类和数量,也可以将不同的功能单体混合使用^[40]。在众多功能单体中较为常用的有甲基丙烯酸和丙烯酰胺。印迹聚合物的选择性与交联剂的种类和用量有密切的关系。根据选择的功能单体的不同可以选择不同的交联剂。目前常用的有乙二醇二甲基丙烯酸酯(EDMA)^[41]、*N,N*-亚甲基双丙烯酰胺^[35-36]、三甲氧基丙烷三甲基丙烯酸酯(TRIM)^[39]等。

MIP 的制备通常是通过自由基引发聚合而成的。可根据不同的制备方法采用不同的引发剂。考虑到蛋白质分子的活性,目前常用偶氮二异丁腈(AIBN)^[41]引发(低温或光引发)或用水溶性的过硫酸盐-四甲基亚乙二胺(TEMED)的氧化-还原体系引发^[35-36]。引发聚合反应前,反应混合液要通氮气除氧,这是因为氧气的存在会淬灭自由基,使聚合反应不完全,甚至不能反应。

1.2 生物大分子印迹聚合物的制备方法

目前,生物大分子印迹聚合物的制备方法大致

分为:包埋法、表面印迹法和抗原决定基法。

1.2.1 包埋法

包埋法也称本体聚合,就是将印迹分子、功能单体、交联剂和引发剂按照一定比例溶解在溶剂中,通过脱气、除氧,经引发聚合后得到块状聚合物,然后再粉碎,过筛,得到小颗粒,进行后续操作。这种制备方法得到的分子印迹聚合物具有令人满意的记忆功能,对蛋白质分子具有良好的选择性识别特性,且合成操作条件易于控制,实验装置简单,便于普及。

Hjerten 等^[35-36]利用包埋法,以丙烯酰胺为单体合成了低交联度的凝胶,对血红蛋白、生长激素、细胞色素、肌红蛋白和核糖核酸酶等进行了印迹,得到了具有良好选择性的分子印迹聚合物。不同的印迹分子能被相应的凝胶所吸附,而非印迹蛋白则不被这种惰性的凝胶吸附。

尽管包埋法印迹技术比较简单,但具有以下弊端^[42]:(1)聚合物形态不规则,要得到小颗粒,需增加对聚合物进行粉碎、过筛等附加程序;(2)在粉碎过程中,不可避免地毁坏部分印迹位点;(3)即使对聚合物进行粉碎后,仍有部分印迹位点被包埋在颗粒内,不能发挥作用;(4)印迹分子不易洗脱,颗粒内部扩散阻力大。

1.2.2 表面印迹法

表面印迹技术是使识别位点处在颗粒的表面,以此克服本体聚合的弊端。通常采用的表面印迹技术是在微球上进行印迹或涂层印迹聚合物,得到的较均匀的球形颗粒适于各种操作,尤其是色谱操作。

早期的蛋白质表面印迹是 Glad 等^[43]将铁传质蛋白在溶液中与硼酸酯硅烷发生作用,然后在多孔硅胶颗粒上进行聚合。由于硼酸酯基团能与铁传质蛋白上的硅酸铝发生不可逆反应,因此硼酸酯硅烷与铁传质蛋白的预结合使得硼酸酯基团能正确排列,从而保证了印迹位点对铁传质蛋白的特异性。通过高效液相色谱(HPLC)的检测,证明该聚合物对铁传质蛋白具有特异性。

另一种表面印迹技术是在金属离子 Cu^{2+} ^[37]、 Co^{2+} ^[44]或 Ni^{2+} ^[45]和核糖核酸酶 A 存在的条件下,利用金属螯合单体在活化的硅胶颗粒上进行聚合(如图 1 所示)。核糖核酸酶 A 存在两个暴露在分子表面的组氨酸,因而可以与两个金属螯合分子进行螯合作用,在聚合过程中金属螯合分子固定在硅胶表面并生成特异性结合部位。该方法的缺陷是蛋白质表面必须有暴露的氨基酸残基,如组氨酸的咪唑基、半胱氨酸的巯基、色氨酸的吲哚基等,从而使该方法的应用范围受到限制。

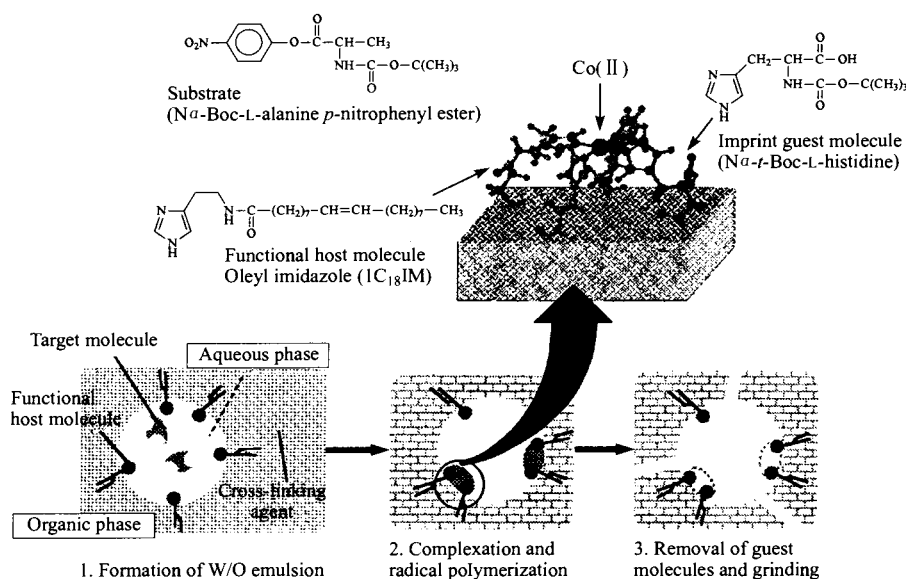


图 1 表面印迹法示意图
Fig. 1 Schematic illustration of surface molecular imprinting technique

还有一种表面印迹技术是基于射频发光放电等离子体聚合/沉积作用。Shi 等^[46]首先将蛋白质吸附在亲水的、分子级平坦的云母表面,然后将一个二糖分子薄层覆盖在吸附的蛋白质上。一经干燥,该糖层便通过大量的氢键与蛋白质络合。然后将一个平坦的含氟聚合物薄膜通过发光放电等离子体与糖分子交联而沉积。接着去除云母并溶解掉蛋白质分子,最终形成一种多糖覆盖的、具有蛋白质形状的纳米凹坑,并可通过透射电子显微镜、原子力显微镜、X 射线光电子能谱和飞行时间第二离子能谱来检测。吸附试验显示在混合蛋白质溶液中,白蛋白、免疫球蛋白、核糖核酸酶 A 和溶菌酶的印迹聚合物都能特异性地吸附相应的印迹蛋白质。

目前较新的一种表面印迹方法是在尺寸单分散性的纳米线状聚合物表面印迹模板分子。Wang 等^[47-48]首先将模板分子固定在表面覆盖铝膜的硅胶纳米棒或纳米管上,然后进行聚合反应,最后用化学方法溶解掉铝膜和硅胶纳米棒或纳米管,洗除模板分子,在纳米线状聚合物表面上即会留下识别孔穴(如图 2^[48]所示)。实验证明这种表面印迹聚合物对印迹分子具有较高的选择性。

1.2.3 抗原决定基法

Kempe 等^[49]以甲基丙烯酸(MAA)和 4-乙烯基吡啶(4-Vpy)为功能单体,乙二醇二甲基丙烯酸酯(EDMA)和三甲氧基丙烷三甲基丙烯酸酯(TRIM)为交联剂,偶氮二异丁腈(AIBN)为引发剂,通过低温光引发的方法分别制备了以不同的多肽为模板分子的印迹聚合物。

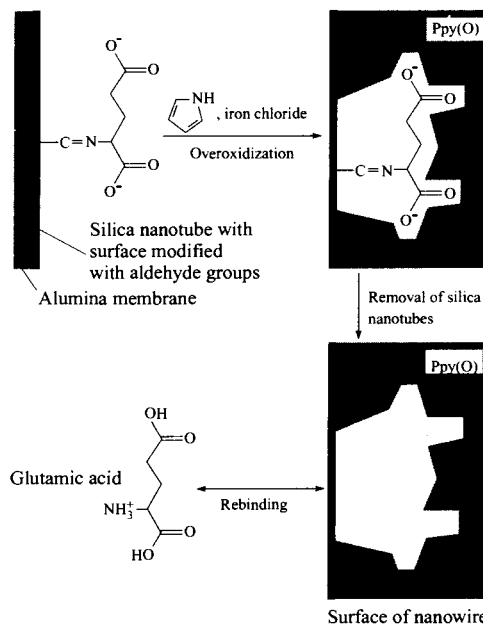


图 2 纳米线状聚合物表面印迹法示意图
Fig. 2 Schematic representation of the molecular imprinting approach employing immobilized template and a sacrificial solid nanotube support

受此启发,Rachkov 等^[50]提出抗原决定基法。其原理来源于自然界中的相似方法,即抗体在识别抗原时,抗体只与抗原的一小部分,即抗原决定基作用。该方法采用与蛋白质结构中暴露在表面的肽链(抗原决定基)相同的短肽作为模板分子,得到的大孔的分子印迹聚合物不仅可识别该肽,也可识别整个蛋白质分子。该方法的优点是经济实惠,这是因为小肽通常比蛋白质便宜,且较易获得。对于 80%

~90% 的蛋白质而言, C-端的 7~9 个氨基酸可作为其特征结构的决定基。聚合过程如图 3^[51] 所示。

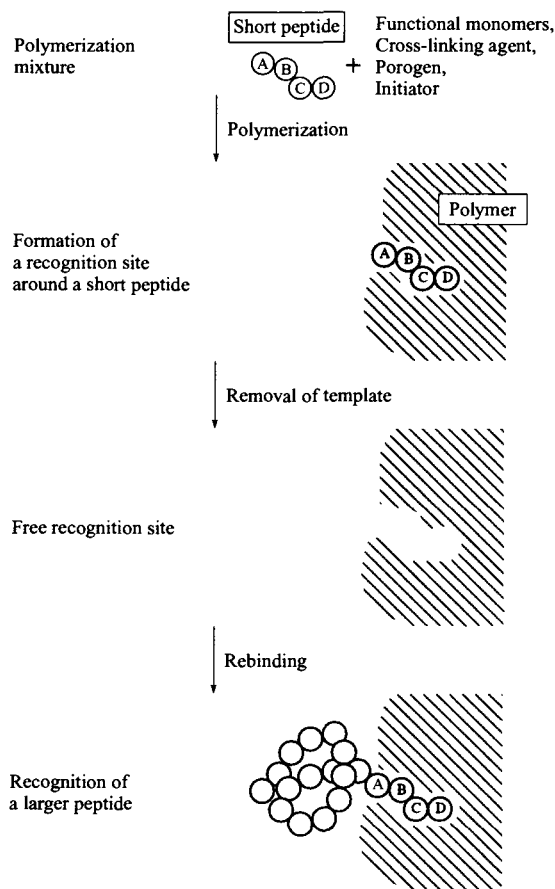


图 3 抗原决定基法示意图

Fig.3 Schematic representation of the epitope approach

Rachkov 等利用该法,以 MAA 为功能单体,以 EDMA 为交联剂,首先对四肽 YPLG (Tyr-Pro-Leu-Gly-NH₂) 进行了印迹。HPLC 检测表明,以 YPLG 为印迹分子得到的聚合物不仅可以识别 YPLG,还可以识别以 PLG (Pro-Leu-Gly-NH₂) 为决定基的催产素分子。

此后, Rachkov 等^[51] 又考察了在水相介质中以抗原决定基法合成的分子印迹聚合物对催产素及其相关多肽的识别。HPLC 检测结果表明,在水相介质中,离子间的相互作用以及催产素及其相关多肽的 N-端氨基酸基团在分子印迹聚合物识别过程中起了重要作用。然而,识别过程的特异性主要取决于疏水作用和氢键作用。此外,流动相中水的含量、离子强度以及 pH 值的增加会减弱分子印迹聚合物的选择性。

2004 年 Rachkov 等^[52] 进一步发展了抗原决定基法。他们以更长的肽链 [Sar1, Ala8] angiotensin II (Sar-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Ala, SA) 为模板分子,在水相介质中合成了分子印迹聚合物。具体合

成方法为:以丙烯酸钠为功能单体,以 EDMA 为交联剂,以脲为引发剂和模板分子混合后放入 pH 值为 7 的 5 mmol/L 磷酸盐缓冲溶液中,在 37 °C 下反应 60 h,得到分子印迹聚合物。他们还以高效液相色谱分离了血管收缩素 (Angiotensin II) 以及模板分子 SA 的混合物(分离谱图如图 4 所示),考察了流动相的 pH 值、磷酸盐缓冲溶液的浓度、流动相中乙腈的含量对被分析物保留因子的影响。

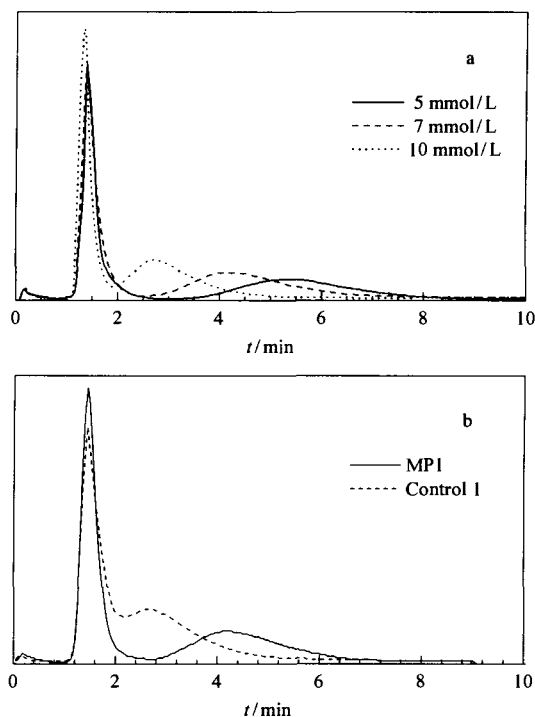


图 4 血管收缩素 (Angiotensin II) 以及模板分子 SA 的混合物的色谱分离图

Fig.4 Separation of mixtures of Angiotensin II and SA
HPLC profiles of mixtures of 50 $\mu\text{mol/L}$ AII (sharp, weakly retained peaks) and 50 $\mu\text{mol/L}$ SA (broad, strongly retained peaks).

a. MIP 1 (molecular imprinting) column with a mobile phase containing 20% acetonitrile and the phosphate buffer (pH 7.2); b. MIP 1 and Control 1 (non-molecular imprinting) columns with a mobile phase containing 7 mmol/L phosphate buffer (pH 7.2) and 20% acetonitrile.

目前用于印迹的蛋白质分子种类见表 1。

表 1 已被用于印迹的蛋白质分子
Table 1 Protein molecules applied in molecular imprint technique

Protein	References
Transferring	[35], [37], [43]
BSA (bovine serum albumin)	[49], [53]
Ribonuclease A	[35], [36], [46], [49]
Urease	[54]
Myoglobin	[36]
Hemoglobin	[36], [54]
Streptavidin	[46]
Pepsin	[55]
Glucose oxidase	[56], [57]

表1 (续)
Table 1 (Continued)

Protein	References
Growth hormone	[35]
Cytochrome C	[35], [58]
Ig G	[55]
Fibrinogen	[46]
Lysozyme	[46], [55]
Albumin	[46], [55]
Bovine trypsinogen	[35]

2 生物大分子的印迹识别机理

人们普遍认为,小分子可形成作用力的基团数目很少,只有当其与介质的作用力较强时才能显示出识别效果。而对于生物大分子的印迹,其识别作用力应是数目众多的遍及介质的较弱作用力,这些弱的相互作用包括氢键、电荷转移、疏水作用和微弱的诱导偶极作用等。Hjerten等^[36]认为蛋白质分子上带有带电或非极性的基团,如果介质上也有大量的同类基团,则相互之间可形成离子作用和疏水作用而使蛋白质被吸附,但这是一种非特异性吸附,因为该介质也可以通过键合作用来吸附其他的非印迹蛋白质。所以对于蛋白质而言,其大多数MIP的特异性没有想像的高的主要原因是配位基(如酶底物、抗体)和功能单体(如甲基丙烯酸)是带电的或非极性的。因此所生成的介质在一定程度上或多或少地带有传统离子交换色谱(带电)或疏水(非极性)色谱的作用,即因为许多强键通常与特异性不吻合而导致特异性丧失;当离子作用和疏水作用同时发生时,这种情况尤其严重。这意味着在制备分子印迹聚合物时,必须用能和蛋白质产生弱的相互作用的功能单体,否则很容易造成非特异性吸附,被吸附的蛋白质很难被完全洗脱。

对于以硅胶为载体的MIP而言,Venton^[54]认为是由于硅胶具有多孔和褶合的表面,因而蛋白质与聚合物之间存在多种关系:蛋白质可被完全包埋在聚合物中,也可被吸附在聚合物的表面,也可被半包埋在聚合物中。当用洗脱液洗脱时,只有表面和半包埋的蛋白质可被完全洗下来,而包埋的蛋白质还保留在聚合物中。因此对介质吸附容量有贡献的只是很少一部分的印迹蛋白。

3 生物大分子印迹技术存在的问题以及应用前景

分子印迹技术在近20年来得到蓬勃发展,分子印迹技术受到了普遍关注,但目前作为一种新型的技术用于生物大分子印迹时仍然存在很多问题^[59-62]。

首先,生物大分子印迹过程和识别过程的机理是亟待解决的问题。对生物大分子和聚合物单体官能团间的相互作用还缺乏系统研究,在识别过程中是孔穴的三维空间结构还是功能基团或其他方面起更主导的作用还存在分歧,而目前致力于这方面研究的学者较少。其次,目前使用的功能单体、交联剂和聚合方法都有较大的局限性,尤其是没有令人满意的聚合方法以得到高吸附量的MIP,这就使得分子印迹技术远远不能满足实际应用的需要。第三,如何寻找到温和而有效的洗脱剂也是亟待解决的问题。现阶段,尚未找到合适的方法洗脱蛋白质印迹分子,活性蛋白质很难得到回收利用。第四,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的印迹微球,限制了分子印迹技术的商业应用。另外,一些有关的介质操作性能也需进一步改进,如吸附容量、机械强度、孔隙率等直接关系到介质是否能够实用化。

尽管生物大分子印迹技术还存在诸多问题,但其优异的性能在下列领域有着潜在的吸引力。

(1)分离领域的应用:生物大分子印迹技术提供了一种简单、直接制备对多肽、蛋白质、核糖等大分子具有识别能力的材料的方法。其对目标分子的特异性吸附具有高选择性的优点在生命科学和医学分析中尤为重要。

(2)模拟抗体:利用生物大分子印迹聚合物制备的模拟抗体可代替天然抗体用于免疫分析中,经过分子印迹的球形聚丙烯酰胺凝胶颗粒可能在放射免疫分析(RIA)和酶联免疫分析(ELISA)中有所应用,这样可不需要用于制备抗体的实验动物及相应的免疫技术。另外,天然抗体难以回收再利用,而模拟抗体可重复利用。

(3)生物传感器:特殊识别现象在传感器技术中极为重要,以蛋白质为印迹分子的高特异性凝胶在此领域有着诱人的前景。根据不同的机理,以酶或抗体作为其特异识别元件,MIP对分析物产生的结合可通过转换器做出快速反应。以生物大分子印迹聚合物制成的传感器除了传统生物传感器的优点外,还有制作成本低、耐受性高、寿命长等优点,可大规模应用。这些还有待于人们进一步研究开发。

参考文献:

- [1] Jiang Zhongyi, Wu Hong. *Molecular Imprinting Technique*. Beijing: Chemical Industry Press (姜忠义, 吴宏. 分子印迹技术. 北京: 化学工业出版社), 2003: 1
- [2] Pauling L. *J Am Chem Soc*, 1940, 62(3): 2 643

- [3] Dickey F H. *Pro Acad Sci*, 1949, 35: 227
- [4] Wulff G, Sarhan A, Zabrocki K. *Tetrahedron Lett*, 1973, 44: 4 329
- [5] Norrlof O, Glad M, Mosbach K. *J Chromatogr*, 1984, 299 (1): 29
- [6] Vlatakis G, Andersson L I, Muller R, Mosbach K. *Nature*, 1993, 361(6 413): 645
- [7] Liu Junqiu, Luo Guimin, Shen Jiacong. *Journal of Functional Polymers* (刘俊秋, 罗贵民, 沈家骢. 功能高分子学报), 1998, 11(4): 561
- [8] You Jing, Chen Shulian, Wang Guojun, Lu Haojie. *Analysis and Testing Technology and Instruments* (游静, 陈淑莲, 王国俊, 陆豪杰. 分析测试技术与仪器), 1999, 5(4): 193
- [9] Kondo Y, Morita Y, Fujimoto A, Tounai M, Kimura S, Yoshikawa M. *Chirality*, 2003, 15(6): 498
- [10] Kafri R, Lancet D. *Chirality*, 2004, 16(6): 369
- [11] Mosbach K. *Anal Chim Acta*, 2001, 435: 3
- [12] Iqbal S S, Lulka M F, Chambers J P, Thompson R G, Valdes J J. *Mater Sci Eng C*, 2000, 7(2): 77
- [13] Morhard F, Pipper J, Dahint R, Grunze M. *Sens Actuators B*, 2000, 70(1/2/3): 232
- [14] Dickert F L, Lieberzeit P, Tortschanoff M. *Sens Actuators B*, 2000, 65(1/2/3): 186
- [15] Liu J Q, Wulff G. *J Am Chem Soc*, 2004, 126(24): 7 452
- [16] Toorisaka E, Uezu K, Goto M, Furusaki S. *Biochem Eng J*, 2003, 14(2): 85
- [17] Okuno H, Kitano T, Yakabe H, Kishimoto M, Deore B A, Siigi H, Nagaoka T. *Anal Chem*, 2002, 74(16): 4 184
- [18] Hart B R, Shea K J. *Macromolecules*, 2002, 35(16): 6 192
- [19] Kempe M, Mosbach K. *Tetrahedron Lett*, 1995, 36(20): 3 563
- [20] Senel S, Kassab A, Arica Y, Say R, Denizli A. *Colloids Surf B*, 2002, 24(3/4): 265
- [21] Asanuma H, Ban T, Gotoh S, Hishiya T, Komiyama M. *Macromolecules*, 1998, 31(2): 371
- [22] Subat M, Borovik A S, Konig B. *J Am Chem Soc*, 2004, 126(10): 3 185
- [23] Cui A, Singh A, Kaplan D L. *Biomacromolecules*, 2002, 3 (6): 1 353
- [24] Martin P, Wilson I D, Jones G R. *J Chromatogr A*, 2000, 889(1/2): 143
- [25] Fu Q, Sanbe H, Kagawa C, Kunimoto K K, Haginaka J. *Anal Chem*, 2003, 75(2): 191
- [26] Sun Hui, Dong Xiangchao, Lü Xianyu, Wang Haibo, Han Jianfang. *Chinese Journal of Chromatography* (孙慧, 董襄朝, 吕宪禹, 王海波, 韩建仿. 色谱), 2003, 21(5): 233
- [27] Graham A L, Carlson C A, Edmiston P L. *Anal Chem*, 2002, 74(2): 458
- [28] Lulka M F, Iqbal S S, Chambers J P, Valdes E R, Thompson R G, Goode M T, Valdes J J. *Mater Sci Eng C*, 2000, 11(2): 101
- [29] Lu Shulai, Cheng Guoxiang, Cai Zhijiang, Pang Xingshou. *Acta Academiae Sinicae* (陆书来, 成国祥, 蔡志江, 庞兴收. 中国医学科学院学报), 2003, 25(10): 640
- [30] Striegler S. *Anal Chim Acta*, 2005, 539(1/2): 91
- [31] Dickert F L, Hayden O, Lieberzeit P, Haderspoeck C, Bindeus R, Palfinger C, Wirl B. *Synth Met*, 2003, 138(1/2): 65
- [32] Burow M, Minoura N. *Biochim Biophys Res Commun*, 1996, 227(2): 419
- [33] Hirayama K, Burow M, Morikawa Y, Minoura N. *Chem Lett*, 1998(8): 731
- [34] Rachkov A, Minoura N. *Biochim Biophys Acta*, 2001, 1 544: 255
- [35] Liao J L, Wang Y, Hjerten S. *Chromatographia*, 1996, 42 (5/6): 259
- [36] Hjerten S, Liao J L, Nakazato K, Wang Y, Zamaratskaia G, Zhang H X. *Chromatographia*, 1997, 44(5/6): 227
- [37] Kempe M, Glad M, Mosbach K. *J Mol Recognit*, 1995, 8 (1/2): 35
- [38] Kriz D, Ramstrom O, Svensson A, Mosbach K. *Anal Chem*, 1995, 87(13): 2 142
- [39] Ye L, Mosbach K. *React Funct Polym*, 2001, 48(1/2/3): 149
- [40] Schweitz L, Andersson L I, Nilsson S. *Analyst*, 2002, 127 (1): 22
- [41] Ye L, Ramstrom O, Mansson M O, Mosbach K. *J Mol Recognit*, 1998, 11: 75
- [42] Guo Tianying, Xia Yongqing, Hao Guangjie, Zhang Banghua. *Chemical Industry and Engineering Progress* (郭天瑛, 夏永清, 郝广杰, 张邦华. 化工进展), 2003, 22(7): 713
- [43] Glad M, Norrlof O, Sellergren B. *J Chromatogr A*, 1985, 347: 11
- [44] Toorisaka E, Uezu K, Goto M, Furusaki S. *Biochem Eng J*, 2003, 14: 85
- [45] Hart B R, Shea K J. *J Am Chem Soc*, 2001, 123(9): 2 072
- [46] Shi H Q, Tsai W B, Garrison M D, Ferrai S, Raitner B D. *Nature*, 1999, 398(6 728): 593
- [47] Yang H H, Zhang S Q, Yang W, Chen X L, Zhuang Z X, Xu J G, Wang X R. *J Am Chem Soc*, 2004, 126(13): 4 054
- [48] Yang H H, Zhang S Q, Tan F, Zhuang Z X, Wang X R. *J Am Chem Soc*, 2005, 127(5): 1 378
- [49] Kempe M, Mosbach K. *J Chromatogr A*, 1995, 691(1/2): 317
- [50] Rachkov A, Minoura N. *J Chromatogr A*, 2000, 889: 111
- [51] Rachkov A, Minoura N. *Biochim Biophys Acta*, 2001, 1 554(1/2): 255
- [52] Rachkov A, Hu M J, Bulgarevich E, Matsumoto T, Minoura N. *Anal Chim Acta*, 2004, 504: 191
- [53] Slade C J. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2000, 9: 97
- [54] Venton D L, Gudipati E. *Biochim Biophys Acta*, 1995, 1 250: 126
- [55] Silvestri D, Cristallini C, Ciardelli G, Giusti P, Barbani N. *J Biomater Sci Polym Ed*, 2004, 15(3): 255
- [56] Burow M, Minoura N. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, 227(2): 419
- [57] Hirayama K, Burow M, Morikawa Y, Minoura N. *Chem Lett*, 1998(8): 731
- [58] Rathbone D L, Ali A, Antonaki P, Cheek S. *Biosensors Bioelectron*, 2005, 20: 2 353
- [59] Dai Yong. *Journal of Yancheng Institute of Technology (Natural Science)* (戴勇. 盐城工学院学报(自然科学版)), 2003, 16(4): 46
- [60] Marx K A. *Biomacromolecules*, 2003, 4: 1 099
- [61] Cormack P A G, Elorza A Z. *J Chromatogr B*, 2004, 804: 173
- [62] Luo Hui, Sun Ruifeng, Shen Zhongyao. *Progress in Biotechnology* (罗晖, 孙瑞丰, 沈忠耀. 生物工程进展), 2001, 21: 63