

复合分子印迹聚合物体系选择性富集 蛋白质样品中的溶菌酶

刘秋叶¹, 盖青青¹, 何锡文¹, 李文友¹, 陈朗星¹, 张玉奎^{1,2}

(1. 南开大学化学学院, 天津 300071; 2. 中国科学院大连化学物理研究所, 大连 116011)

摘要 考察了功能单体与模板蛋白的反应摩尔比、溶液 pH 值及离子强度对功能单体与模板蛋白之间相互作用的影响, 得出制备分子印迹聚合物的最佳条件. 在最佳条件下, 以溶菌酶(Lyz)为模板分子, 丙烯酰胺(AA)和 *N,N'*-亚甲基双丙烯酰胺(BisAA)为聚合基质, 二氧化硅为固体制孔剂, 制备了复合分子印迹聚丙烯酰胺凝胶, 并用平衡吸附实验研究了其吸附性能和识别选择性. 研究表明, 该聚合物对模板蛋白有较高的亲和性、选择性和吸附容量, 可以从蛋白质混合溶液中分离富集模板分子.

关键词 复合分子印迹聚合物; 溶菌酶; 二氧化硅; 聚丙烯酰胺凝胶

中图分类号 O657.3

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2008)03-0505-05

分子印迹聚合物(Molecularly imprinted polymers, MIPs)是一种可以识别目标分子的人工受体, 它与天然产物相比, 具有高选择性、化学和机械稳定性等优点^[1,2], 这些特点是其它分离技术很难具备的. 近年来分子印迹技术(Molecularly imprinting technology, MIT)发展很快, 已经成功地应用于色谱填料、固相萃取、催化和生物传感器等领域^[3~6]. 目前比较成熟的印迹研究工作主要集中在一些简单的小分子上, 如氨基酸、药物、除草剂和金属离子等^[7~11]; 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、可结合位点多及容易变性失活等因素, 采用常规方法对其进行印迹研究相当困难; 但仍有不少学者对印迹蛋白质进行了有益的尝试, 并且取得了很大的进展^[12~21].

聚丙烯酰胺具有良好生物兼容性, 并有柔软的大孔结构, 容易使体积庞大的蛋白质进出等优点. 迄今为止, 已有很多研究工作者用聚丙烯酰胺制备了识别蛋白质的分子印迹聚合物^[12~21].

将具有大孔和较大比表面积的基本体, 如二氧化硅、三氧化二铝和二氧化钛等氧化物加入到预聚合溶液中, 与模板分子、交联剂和功能单体共同预组装, 形成具有特殊性能的分印迹聚合物. 把制孔剂基体和模板分子从聚合物中移除后, 得到大孔聚合物, 同时留下使模板分子容易进出的大孔通道和与其互补的识别位点. 应用此印迹过程, 能成功地印迹小分子, 如有机分子、氨基酸和短肽等^[22~25].

本文选用二氧化硅作制孔剂, 可明显提高分子印迹聚合物对大分子(如蛋白质)的吸附容量. 采用紫外光谱法考察了功能单体与模板分子的反应摩尔比、溶液 pH 值及离子强度对功能单体与模板分子间相互作用的影响, 确定了制备印迹凝胶聚合物的最佳条件. 在此条件下, 以溶菌酶为模板分子, 丙烯酰胺为功能单体, *N,N'*-亚甲基双丙烯酰胺为聚合基质, 二氧化硅为固体制孔剂, 制备了可以富集大分子的印迹聚丙烯酰胺凝胶. 同时考察了该印迹凝胶聚合物的吸附性能和识别选择性.

1 实验部分

1.1 试剂和仪器

二氧化硅(40 ~ 60 μm , 15 nm, 百灵威化学技术有限公司); 溶菌酶(Lyz, $M_w = 14300$, $pI = 11.0$)、

收稿日期: 2007-06-12.

基金项目: 国家“九七三”计划(批准号:2007CB914101)、国家自然科学基金(批准号: 20675040)和天津市自然科学基金(批准号: 06YFJMJC02800, 07JCYBJC00500)资助.

联系人简介: 何锡文, 男, 教授, 博士生导师, 从事分子识别与分子光谱研究. E-mail: xiwenhe@nankai.edu.cn

张玉奎, 男, 研究员, 博士生导师, 中国科学院院士, 从事色谱基础理论与新技术开发应用研究. E-mail: ykzhang@dicp.ac.cn

卵蛋白(OB, $M_w = 45000$, $pI = 4.7$)和牛血清白蛋白(BSA, $M_w = 66000$, $pI = 4.9$)购于上海蓝季科技公司; 丙烯酸胺(AA)和十二烷基硫酸钠(SDS)购于天津永大化学试剂厂; N,N' -亚甲基双丙烯酰胺(MBA, 天津市化学试剂研究所); 过硫酸铵(APS, 天津北方天医化学试剂厂); 四甲基乙二胺(TEMED, 北京前进化学试剂厂). 其余化学试剂均为分析纯, 实验用水均为二次蒸馏水. 岛津 UV-2450 可见分光光度计.

1.2 功能单体与模板分子的相互作用

用紫外分光光度法考察了功能单体与模板分子反应的摩尔比、以及 pH 值和离子强度对其相互作用的影响.

用 ΔA 评价功能单体和蛋白质相互作用的程度:

$$\Delta A = (A_{Lyz} + A_{AA})_{Theor} - A_{Experim} \quad (1)$$

式中, ΔA 为模板分子与功能单体吸光度的理论加和值与实验测定值之差; A_{Lyz} 为模板分子的吸光度; A_{AA} 为功能单体的吸光度; $A_{Experim}$ 为模板分子和功能单体相互作用的吸光度实验测定值.

1.3 溶菌酶印迹聚合物的制备

将溶菌酶(30 mg)、丙烯酸胺(900 mg)和 N,N' -亚甲基双丙烯酰胺(100 mg)溶解到盛有 1.0 g 二氧化硅的 5 mL pH 为 6.20 的 0.01 mol/L 磷酸缓冲溶液中, 超声脱气 15 min, 再加入 20 mg 过硫酸铵和 20 μ L 四甲基乙二胺, 室温下过夜聚合. 生成的凝胶聚合物经研磨, 过 60 目筛, 然后用过量的 HF 溶解聚合物中的二氧化硅, 再用水反复洗去 HF 至中性. 以体积分数为 10% 的乙酸和质量分数为 10% 的十二烷基硫酸钠作为洗脱液, 振荡洗去模板分子, 直到紫外光谱检测不到模板分子为止. 用 0.01 mol/L 磷酸缓冲溶液(pH = 6.20)反复振荡洗涤, 即可得到交联度为 10% 的印迹凝胶聚合物.

非印迹凝胶聚合物的制备除不加模板分子溶菌酶以外, 其余步骤同上.

1.4 吸附实验

为了检测凝胶聚合物的吸附性能, 将 50.0 mg 凝胶印迹聚合物置于离心管中, 加入 5 mL 0.3 mg/mL 的溶菌酶溶液(pH = 6.20). 室温下, 置于振荡器上振荡吸附. 每隔一段时间, 将离心管以 3000 r/min 的速度离心 5 min, 移取上层清液, 用分光光度计在 280 nm 处测定溶液的吸光度.

吸附容量(Q)由吸附前后溶液中蛋白质浓度的变化、溶液体积和凝胶聚合物的质量计算. Q 定义为每单位质量凝胶聚合物的吸附容量:

$$Q = (c_0 - c_t) V / m \quad (2)$$

式中, c_0 为初始蛋白质浓度(mg/mL), c_t 为不同时间的蛋白质浓度(mg/mL), V 为蛋白质溶液体积(mL), m 为凝胶聚合物的质量(g).

同时考察了竞争吸附实验中分子印迹聚合物对溶菌酶的吸附性能. 分别选取牛血清白蛋白和卵蛋白为竞争蛋白. 称取一系列 50.0 mg 凝胶聚合物置于离心管中, 分别加入 5 mL 模板蛋白与竞争蛋白的混合溶液, 振荡吸附 2 h. 根据吸光度加和法, 在合适的波长下, 计算得到吸附后每种蛋白质的浓度.

2 结果与讨论

2.1 功能单体与模板分子的相互作用研究

紫外吸收光谱提供了一种考察功能单体与模板分子结合程度的方法, 适用于研究功能单体与模板分子的作用情况. 实验值和理论加和值的吸光度差值越大, 即说明功能单体与模板分子相互作用越强. 图 1 表明, 选用 200 nm 作为测定波长, 当功能单体与模板分子的摩尔比约为 200:1 时, ΔA 达到最大值, 再增加功能单体的用量时, 差值几乎不变, 即功能单体与模板分子在摩尔比约为 200:1 时, 形成了一个稳定的缔合物.

蛋白质与功能单体的相互作用明显高于相应模板为小分子的数值, 其原因可能是: 小分子与功能单体作用时, 通常只有几个功能基团参与; 但蛋白质分子有许多氨基酸残基均能与功能单体相互作用. 在实际聚合时, 丙烯酸胺不仅可作为功能单体, 而且还是形成凝胶基体的主要部分; 所以在实际聚合的过程中, 需要适当增加丙烯酸胺的用量.

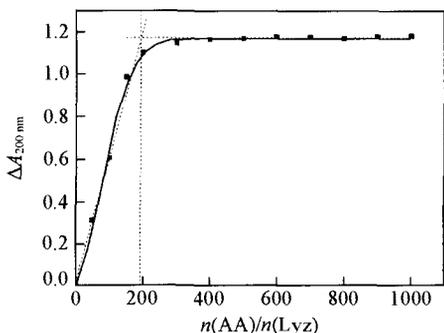


Fig. 1 Relationship between ΔA value at 200 nm and the molar ratio of AA to Lyz

$$\Delta A = (A_{Lyz} + A_{AA})_{Theory} - A_{Experiment}, c(Lyz) = 2 \times 10^{-6} \text{ mol/L}, c(AA) = 6 \times 10^{-4} \sim 2 \times 10^{-3} \text{ mol/L}, \text{pH} = 6.20, t = 25 \text{ }^\circ\text{C}.$$

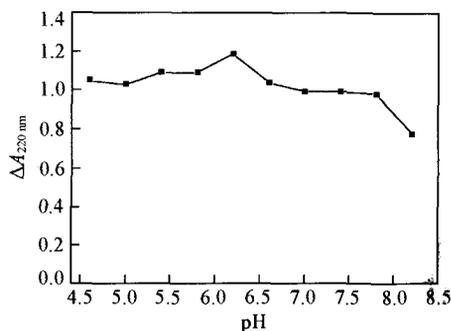


Fig. 2 Effect of the different pH on the trend of ΔA value at 200 nm

$$c(Lyz) = 2 \times 10^{-6} \text{ mol/L}, c(AA) = 6 \times 10^{-4} \text{ mol/L}, \text{pH} = 6.20, t = 25 \text{ }^\circ\text{C}.$$

2.2 pH 的影响

蛋白质在不同的 pH 介质中, 所带的电荷不同, 电荷将影响蛋白质与功能单体的相互作用. 考察不同 pH 条件下, 功能单体与模板分子的相互作用情况, 结果如图 2 所示. 当 pH 为 6.20 时, ΔA 值最高, 表明功能单体与模板蛋白在此 pH 值下的作用最强. 因此, 选择 pH 为 6.20 的 0.01 mol/L 的磷酸缓冲溶液作为聚合和吸附的缓冲体系.

2.3 离子强度的影响

通常, 为了保持蛋白质的生物活性, 蛋白质样品经常采用稀的氯化钠溶液制备. 但是加入氯化钠后, 功能单体与模板分子或与离子之间的竞争作用将会影响功能单体与模板分子之间的反应. 少量氯化钠的加入, 使 ΔA 值减小, 即功能单体与模板分子之间的作用力随之减弱. 因此氯化钠与功能单体之间的竞争作用不利于功能单体与蛋白质的作用, 也不利于对蛋白质的吸附. 故本工作在制备和吸附的过程中均没有加入氯化钠, 仅选用磷酸缓冲溶液体系作为反应介质.

2.4 二氧化硅的作用

为了证明二氧化硅能增加聚丙烯酰胺凝胶的比表面积以及吸附性能, 制备了两种凝胶聚合物, 一种是在聚合过程中加入二氧化硅, 一种是在聚合过程中没有加入二氧化硅. 同时考察其吸附性能.

由图 3 可见, 加入二氧化硅得到的聚合物的吸附性能远远好于没有加入二氧化硅的吸附性能, 吸附容量提高了近 8 倍. 这说明当模板蛋白和二氧化硅共同存在时, 先预组装共聚, 然后从聚合体系中移除模板蛋白和二氧化硅后, 留下与蛋白质形状匹配的孔穴和位点及使其容易进出的大孔渠道. 另外, 尚可以推测二氧化硅表面的孔穴能有效地增加凝胶聚合物的比表面积, 从而增加聚合物的吸附容量. 从图 3 还可以看出, 在制孔剂二氧化硅存在下, 制备的分子印迹聚合物的识别位点几乎位于聚合物的表面, 能快速达到吸附平衡. 可见, 二氧化硅的作用是不容忽视的, 它是提高选择性吸附模板分子的关键因素.

2.5 等温吸附线

为了进一步检测凝胶聚合物的吸附性能, 在溶菌酶起始质量浓度为 0.2 ~ 1.0 mg/mL 的范围内, 研究了聚合物的吸附等温线. 平衡吸附 2 h 以后, 计算测定了每个浓度下的饱和吸附容量. 吸附容量

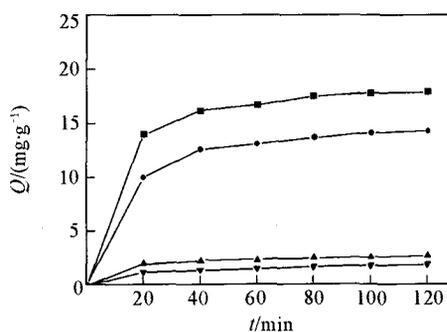


Fig. 3 Adsorption capacity-time curves of polymer polymerized with silica or without silica

■ MIP-Lyz with silica; ● NMIP-Lyz with silica; ▲ MIP-Lyz without silica; ▼ NMIP-Lyz without silica. $c_0 = 0.3 \text{ mg/mL}, V = 5 \text{ mL}, m = 50 \text{ mg}, \text{pH} = 6.20, t = 25 \text{ }^\circ\text{C}.$

用 Scatchard 方程处理:

$$Q/c = Q_{\max}/K - Q/K \quad (3)$$

式中, c (mg/mL) 是溶菌酶的平衡浓度, Q (mg/g) 是每一个浓度下的平衡吸附容量, Q_{\max} (mg/g) 是最大吸附容量, K (mg/mL) 是平衡常数.

Q/c 值对平衡吸附容量 Q 作图为 2 条相交的直线(图 4). 由此可见, 聚合物基体在吸附过程中, 表现出两类不同的结合位点, 分别为低亲和力和高亲和力. 线性回归方程分别是

$$Q_1/c_1 = 593.09 - 23.87Q_1 (\gamma = 0.9994)$$

$$Q_2/c_2 = 221.24 - 7.17Q_2 (\gamma = 0.9972)$$

由方程式计算得知,

$$K_1 = 0.0419 \text{ mg/mL}, Q_{\max 1} = 24.58 \text{ mg/g}$$

$$K_2 = 0.139 \text{ mg/mL}, Q_{\max 2} = 30.75 \text{ mg/g}$$

2.6 竞争性吸附实验

竞争性吸附实验选择牛血清白蛋白和卵蛋白作为竞争底物, 组成溶菌酶和牛血清白蛋白以及溶菌酶和卵蛋白的混合溶液, 吸附选择性的结果列于表 1. 其中溶液和凝胶聚合物的分配系数为 K_D , 定义 $K_D = c_p/c_s$, c_p (mg/mL) 是蛋白质吸附于聚合物上的质量浓度, c_s (mg/mL) 为蛋白质溶液的浓度. 用分离因子 (α) 评价聚合物的识别选择性, α 定义为 $\alpha = K_{D1}/K_{D2}$, 其中 K_{D1} 为模板蛋白的分配系数, K_{D2} 为竞争蛋白的分配系数.

Table 1 Separation results of MIP and NMIP from protein mixture*

Mixture solution	Substrate	K_D for MIP	K_D for NMIP	α for MIP	α for NMIP
Lyz + BSA	Lyz	1.6000	1.0300	37.56	3.52
	BSA	0.0426	0.2930		
Lyz + OB	Lyz	1.5900	0.8810	29.17	19.36
	OB	0.0545	0.0455		

* c_0 of Lyz was 0.3 mg/mL; c_0 of BSA and OB is 0.2 mg/mL in the mixed protein solution; $V = 5$ mL, $m = 50$ mg, $\text{pH} = 6.20$, $t = 2$ h, temperature = 25 °C.

表 1 数据说明, 模板蛋白溶菌酶的分配系数远大于竞争蛋白的分配系数. 由此可看出, 模板蛋白与功能单体所形成的氢键和静电作用, 以及产生的微环境和互补孔穴对识别模板蛋白均有选择吸附作用. 而竞争蛋白缺乏印迹过程, 故还是物理吸附占主导作用.

由此推论, 在优化条件下制备的印迹凝胶对模板蛋白有选择性识别作用. 当溶菌酶与牛血清白蛋白或卵蛋白作为混合样品时, 可以使用该印迹凝胶聚合物选择性地富集模板蛋白溶菌酶, 从而与竞争蛋白进行有效的分离.

参 考 文 献

- [1] Dickert F. L., Hayden O.. Anal. Chem. [J], 2002, **74**: 1302—1306
- [2] Shi H. Q., Tsai W. B., Garrison M. D., et al.. Nature [J], 1999, **398**: 593—597
- [3] Schweitz L.. Anal. Chem. [J], 2002, **74**: 1192—1196
- [4] LI Li (李礼), HU Shu-Guo (胡树国), HE Xi-Wen (何锡文). Chem. J. Chinese Universities (高等学校化学学报) [J], 2006, **27**(4): 608—611
- [5] Wulff G.. Chem. Rev. [J], 2002, **102**: 1—28
- [6] Haupt K., Mosbach K.. Chem. Rev. [J], 2000, **100**: 2495—2504
- [7] Cormack P. A. G., Mosbach K.. React. Funct. Polym. [J], 1999, **41**: 115—124
- [8] Wulff G.. Angew. Chem. Int. Edit. [J], 1995, **34**: 1812—1832
- [9] LU Chun-Yang (卢春阳), HE Hai-Cheng (何海成), MA Xiang-Xia (马向霞), et al.. Acta Chimica Sinica (化学学报) [J], 2004, **62**(8): 799—803

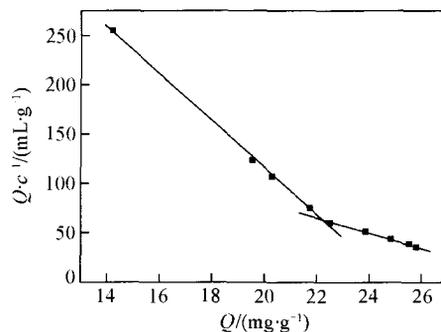


Fig. 4 Scatchard plots of $Q \cdot c$ versus Q

c_0 : 0.2—1.0 mg/mL, $V = 5$ mL, $m = 50$ mg, $\text{pH} = 6.20$, $t = 2$ h, temperature = 25 °C.

- [10] Hu S. G., Li L., He X. W.. *J. Chromatogr. A*[J], 2005, **1062**: 31—37
- [11] Hu S. G., Wang S. W., He X. W.. *Analyst(London)*[J], 2003, **128**: 1485—1489
- [12] LI Yong(李永), YANG Huang-Hao(杨黄浩), ZHUANG Zhi-Xia(庄峙厦), *et al.*. *Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)*[J], 2005, **26**(9): 1634—1636
- [13] Pang X. S., Cheng G. X., Lu S. L.. *Anal. Bioanal. Chem.*[J], 2006, **384**: 225—230
- [14] ZHANG Shu-Qiong(张淑琼), YANG Huang-Hao(杨黄浩), ZHUANG Zhi-Xia(庄峙厦), *et al.*. *Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)*[J], 2004, **25**(6): 1028—1030
- [15] Guo T. Y., Xia Y. Q., Hao G. J., *et al.*. *Carbohydrate Polymers*[J], 2005, **62**: 214—221
- [16] Li Y., Yang H. H., You Q. H., *et al.*. *Anal. Chem.*[J], 2006, **78**: 317—320
- [17] Huang T., Zhang J., Zhang J. Q., *et al.*. *J. Appl. Polym. Sci.*[J], 2005, **95**: 358—361
- [18] Pang X. S., Cheng G. X., Li R. S., *et al.*. *Anal. Chim. Acta*[J], 2005, **550**: 13—17
- [19] Liao J. L., Wang Y., Hjerten S.. *Chromatographia*[J], 1996, **42**: 259—262
- [20] Hjerten S., Liao J. L., Nakazato K., *et al.*. *Chromatographia*[J], 1997, **44**: 227—234
- [21] Tong D., Hetenyi Cs., Bikadi Zs., *et al.*. *Chromatographia*[J], 2001, **54**: 7—14
- [22] Lettau K., Warsinke A., Laschewsky A., *et al.*. *Chem. Mater.*[J], 2004, **16**: 2745—2749
- [23] Yilmaz E., Haupt K., Mosbach K.. *Angew. Chem. Int. Ed.*[J], 2000, **39**: 2115—2118
- [24] Titirici M. M., Hall A. J., Sellergren B.. *Chem. Mater.*[J], 2002, **14**: 21—23
- [25] Titirici M. M., Hall A. J., Sellergren B.. *Chem. Mater.*[J], 2003, **15**: 822—824

Matrix Molecularly Imprinted Polymer for Enriching Lysozyme in Protein Samples

LIU Qiu-Ye¹, GAI Qing-Qing¹, HE Xi-Wen^{1*}, LI Wen-You¹, CHEN Lang-Xing¹, ZHANG Yu-Kui^{1,2*}

(1. *College of Chemistry, Nankai University, Tianjin 300071, China;*

2. *Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116011, China)*

Abstract The effects of the molar ratio of functional monomer to template protein, the pH and the ionic strength of the medium on the interaction between the functional monomers and template protein were primarily investigated from the molecular level by UV spectrophotometry. Then lysozyme (Lyz)-imprinted polyacrylamide gel was prepared to recognize effectively Lyz in protein samples. With acrylamide and *N,N'*-methylene diacrylamide as the polymeric matrix and silica as the pore-forming reagent, after template and silica were removed, the surface of gel polymer had a large quantity of well-distributed macropores, which were suited to let the proteins pass in and out. The recognition and selectivity of the imprinted polymers were studied with equilibrium adsorption. Selective adsorption experiments of the imprinted gel show that imprinted gel exhibited good recognition capability for Lyz compared with bovine serum albumin or ovalbumin as the competitive substance.

Keywords Matrix molecular imprinting polymer; Lysozyme; Silica; Polyacrylamide gel

(Ed.: H, J, Z)