

# 蛋白质分子印迹技术的研究进展及应用前景

孙寅静, 罗文卿, 潘俊\*

(复旦大学药学院, 上海 201203)

**摘要:** 分子印迹技术是在聚合物材料的合成过程中构建与模板分子在大小、形状和结构功能上都互补的特定结合位点, 这样的材料对其模板具有选择性结合能力。尽管小分子印迹技术近年来发展迅速, 蛋白质分子印迹却由于蛋白质的体积庞大、结构灵活、构象复杂成为既有意义又具挑战性的研究领域。本文总结了近五年来蛋白质分子印迹技术的研究报道, 综述了其技术特点、最新进展和应用前景。

**关键词:** 分子印迹; 蛋白质; 制备; 表征; 应用前景

中图分类号: R943

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2011) 02-0132-06

## Recent advances and perspective in the study of the molecular imprinting of proteins

SUN Yin-jing, LUO Wen-qing, PAN Jun\*

(School of Pharmacy, Fudan University, Shanghai 201203, China)

**Abstract:** Molecular imprinting technique (MIT) involves the synthesis of polymer in the presence of a template to produce complementary binding sites in terms of its size, shape, and functional group orientation. Such kind of polymer possesses specific recognition ability towards its template molecule. Despite the rapid development of MIT over the years, the majority of the template molecules that have been studied are small molecules, while molecular imprinting of proteins remains a significant yet challenging task due to their large size, structural flexibility and complex conformation. In this review, we summarize the research findings over the past five years, and discuss the characteristics of the technique, the most recent progress and the perspective in the field of molecular imprinting of proteins.

**Key words:** molecular imprinting; protein; preparation; characterization; perspective

分子印迹就是将模板分子与功能单体通过共价、非共价或金属协同作用形成预聚合物, 在交联剂的作用下功能单体发生聚合, 将模板分子固定于聚合物中, 最后脱除模板分子, 即在聚合物材料上留下与模板分子在大小、形状和官能团的方向上都互补的空穴结构。空穴不仅保留了与模板分子化学结构互补的官能团的有序排列, 也维持了它的整个空间构象<sup>[1]</sup>, 所以当材料再次遇到模板分子时, 可发生特异性的

结合。分子印迹过程如图 1 所示。

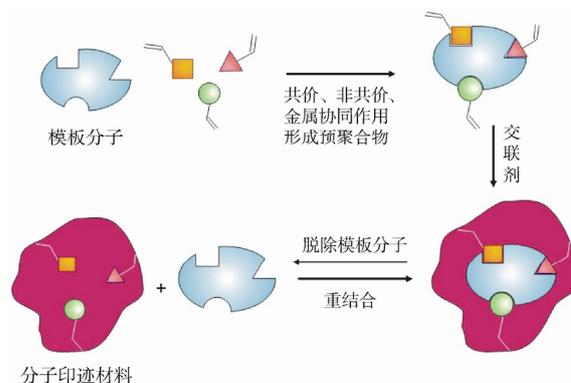


图 1 分子印迹过程示意图

收稿日期: 2010-09-06.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30973653).

\*通讯作者 Tel: 86-21-51980092, Fax: 86-21-51980090,

E-mail: panjun@fudan.edu.cn

自20世纪70年代以来,分子印迹技术迅速发展,因其存在巨大的潜在应用价值,受到广泛的关注,成为材料学、分析化学、生物化学和生物医药等领域研究的前沿。在过去20年中,对分子印迹材料的研究层出不穷,印迹的模板分子包括糖类、甾体、杀虫剂、药物分子和氨基酸衍生物等<sup>[2]</sup>,其应用领域涉及色谱填料、固相萃取、给药系统、催化和生物传感器等。但成功的例子多是以一些小分子为模板,对生物大分子尤其蛋白质印迹材料的研究却相对滞后。事实上,分子印迹材料与模板蛋白的结合非常类似天然抗原-抗体或配体-受体的结合,其物理和化学稳定性又远高于天然抗体。这些特点决定了蛋白质分子印迹材料在临床检验、医疗诊断、色谱分析和蛋白多肽分离纯化等领域具有巨大的潜在应用价值<sup>[3]</sup>。近来,又有研究者将其应用于酶抑制剂和解毒药的研究,取得了突破性的成果。随着人类疾病分子生物学、基因工程和蛋白质工程等领域研究的突飞猛进,各种新型生物分子靶标不断涌现,为新药研发提供了新的手段,其中不乏以抗体或其他生物活性物质为靶头设计的新型给药系统。然而生物活性物质本身易受体内环境因素破坏、易产生免疫原性等问题常阻碍了这类研究的进一步深入和临床应用。蛋白质分子印迹技术则可以将靶标分子直接印迹于材料上,当印迹材料再次与靶标分子相遇时可发生特异性结合。因此,这项技术有望在新药研发和靶向给药系统研究领域发挥一定的作用,也使分子印迹技术有了更广阔的应用前景。本文作者正在开展以蛋白分子印迹技术进行给药系统的设计,并已取得初步结果。在研究过程中,作者查阅了大量相关文献,并重点比较了蛋白分子印迹材料的制备及其表征方法。

## 1 蛋白质分子印迹的特点

分子印迹材料与模板蛋白的结合既有类似天然“抗原-抗体”的特异性结合特征,又有天然抗体所不具备的诸多优势,如:印迹材料在高温、高压、极端pH条件和有机试剂中可保持稳定,便于储存;其价格低廉,工艺重现性好,适合大规模生产<sup>[4]</sup>。所以研发可以在生理条件下识别蛋白质、从而模拟自然过程的分子印迹“人造抗体”具有很大的潜在应用价值。

然而,受其理化性质及构效关系的限制,蛋白质分子印迹技术发展缓慢,迄今仍是极具挑战性的研究领域:第一,蛋白质结构灵活、构象复杂,极易受到温度或环境的影响。从热力学角度和实际操作过程而言都不易实现印迹<sup>[4]</sup>。第二,小分子印迹通常采用

交联程度很高的材料来实现,因高交联度可保证单体材料结合于模板周围形成牢固的识别位点。然而,高交联度材料会阻止蛋白类大分子自由进出聚合物网络,一方面导致模板分子难以脱除,另一方面造成模板分子难以进入印迹位点并与其重结合。第三,传统小分子印迹材料往往在有机试剂中进行聚合,而蛋白质在有机试剂中溶解度低,并在有机试剂中可表现出与生理条件下完全不同的构象,这种构象的改变对蛋白质的生物活性会产生很大的影响,极有可能在材料上留下错误的“印迹”。有研究者认为材料识别模板的环境最好与材料聚合时的微环境一致,从而尽可能保持蛋白的构象不变,因此水溶液可能是最适合制备蛋白质印迹材料的介质<sup>[5]</sup>。第四,多数蛋白质印迹材料的构建是基于非共价印迹的原理,即材料和模板的结合是通过氢键、范德华力、离子相互作用和疏水作用实现的<sup>[6]</sup>。而水的极性很大,可能影响单体材料和模板蛋白的氢键相互作用,从而削弱印迹的效果。通过模板与单体材料间的多位点协同作用及多种非共价键的协同作用可提高印迹材料的选择性<sup>[7]</sup>。

以上表明,要实现蛋白质大分子印迹需在传统小分子印迹的基础上加以改进和创新。研究者们正试图寻求能突破瓶颈的蛋白质印迹新手段。

## 2 蛋白质分子印迹材料的制备与表征

### 2.1 整体印迹 (Bulk imprinting)

整体印迹是早期制备分子印迹材料所常用的方法。蛋白质模板分子与功能单体通过共价键、非共价键或金属协同作用结合,随后功能单体在交联剂的作用下发生聚合,使蛋白质分子被整个固定在聚合物骨架中。通过洗涤或提取的方法脱除模板蛋白后,即在材料内留下大小形状和结合位点与模板蛋白完全匹配的三维空穴结构。为便于模板蛋白质分子与印迹材料重结合,还需对聚合物进行研磨粉碎,使蛋白质印迹位点暴露出来。此法最常用的材料是丙烯酰胺及其衍生物,其聚合物的交联度低,便于大分子的进出,并具有极好的亲水性。

Hawkins等<sup>[8]</sup>以异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 标记的白蛋白为模板蛋白,丙烯酰胺和N,N'-亚甲基双丙烯酰胺分别为功能单体和交联剂,用整体印迹法制备印迹材料。共聚焦显微镜图片显示,标记了荧光的模板蛋白均匀分布于分子印迹凝胶骨架材料中,材料经10%十二烷基硫酸钠 (sodium dodecylsulfate, SDS)/10%醋酸溶液洗涤后荧

光消失,证明 SDS 溶液可以使印迹蛋白变性并将其脱离。

Ye 等<sup>[9]</sup>设计了新型功能单体,可以通过金属协同作用与模板蛋白的特定氨基酸序列结合,以此构造更均一的结合位点,并在一定程度上减小非特异性吸附。*N*-(4-乙烯基)-苯甲基亚胺基双醋酸 (*N*-(4-vinyl)-benzyl iminodiacetic acid, VBIDA) 是一种金属螯合单体,它可与二价铜离子螯合作为“桥梁”,再通过铜离子与蛋白表面暴露的组氨酸相互作用形成复合物。由于乙二胺四乙酸 (ethylene diaminetetraacetic acid, EDTA) 与铜离子有更强的螯合作用,可以打断这座“桥梁”,将模板蛋白脱离,从而在材料上留下特异性结合位点。

Qin 等<sup>[10]</sup>以溶菌酶为模板蛋白, *N*-异丙基丙烯酰胺、丙烯酰胺和 VBIDA 为功能单体,用冷冻聚合法制得印迹溶菌酶的热敏大孔水凝胶。这种智能水凝胶对模板蛋白表现出很强的吸附能力,印迹因子可达 7.87,并能在多种蛋白的混合溶液中对模板蛋白实现成功分离。

Brown 等<sup>[11]</sup>用溶胶-凝胶法制备无定形聚硅氧烷印迹材料,与传统的有机材料相比,此种无机材料对模板蛋白结合力强,选择性好,蛋白进出材料骨架速度快。

整体印迹法工艺虽简单,但后续处理复杂耗时,所得材料需经研磨和过筛才能得到所需粒径范围的颗粒,并不适合工业化生产。另外,此种方式制得的材料外形不规则,限制了其在色谱和固相萃取领域的应用<sup>[12]</sup>。最重要的是,整体聚合时不可避免地会有大量的印迹位点分布于材料内部,不利于蛋白质的进出。

## 2.2 表面印迹 (Surface imprinting)

在聚合物的表面或近表面构造模板蛋白的结合位点称为“表面印迹”。与整体印迹旨在构造蛋白特异性三维结构不同的是,表面印迹的特点是在材料的表面构建蛋白的“二维印迹”。这样的二维印迹材料从某种程度上解决了生物大分子难以进出聚合物材料的问题,可大大缩短蛋白扩散进入材料并达到平衡的时间。然而,与“三维印迹”材料相比,“二维印迹”材料可能会出现对模板蛋白选择性降低的问题。

为达到“表面印迹”的目的,研究者们曾尝试过多种方法,包括印迹膜材、核-壳结构材料、印迹微球和纳米粒等,同时对印迹效果的表征方法也进行了许多探索。多数文献采用模板蛋白与印迹材料

的平衡结合实验这一间接方法。这种方法是通过模板蛋白与材料结合达到平衡后,测定结合前后上清液浓度的变化来确定材料与模板结合的量。鉴于表面印迹材料的特点,也有研究人员尝试利用更微观的方式为印迹位点的存在提供更直接的证明,这些方式包括石英晶体微天平 (quartz crystal microbalance, QCM)、原子力显微镜 (atomic force microscopy, AFM) 和 BET 吸附法 (Brunauer - Emmett - Teller method) 等。

**2.2.1 印迹膜材 (Molecularly imprinted polymer)** 表面印迹的一种常用方法是在合适的基质 (支撑物) 表面生成一层印迹聚合物薄膜。使用 AFM 可清晰拍摄出材料表面与模板蛋白形状互补、大小相近的孔穴。

El Kirat 等<sup>[13]</sup>首先对玻璃板进行硅烷化,用双功能交联剂将模板蛋白接枝于其上,继而在表面进行单体材料丙烯酰胺的聚合,由此制得二维结构印迹材料。该研究小组首次用 AFM 对材料进行表征。AFM 对材料表面的局部图像显示,印迹薄膜上分布有许多与模板蛋白大小形状互补的小孔穴,而非印迹薄膜图像模糊,无明显凹坑。Su 等<sup>[14]</sup>选用甲基丙烯酸为功能单体,聚乙二醇 400 二甲基丙烯酸酯为交联剂,用微接触印迹法制备了卵清蛋白印迹薄膜。印迹薄膜的 AFM 图像显示,材料上分布有直径约 34 nm 的孔穴,材料经蛋白重结合后的图像表明卵清蛋白以直径为 32~36 nm 的蛋白簇形式重结合于表面的孔穴中。

此外,AFM 的另一重要应用是基于 AFM 的力学图谱可以精确地测量蛋白与材料的相互作用力。El Kirat 等<sup>[13]</sup>将模板蛋白细胞色素 c 共价结合于 AFM 的探针上,借助力-距离曲线探测出其在纳米尺度的范围内与印迹材料的特异性结合力在 85~95 pN 之间。将非模板蛋白牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 共价结合于探针上作为对照,结果发现探针与印迹材料没有特异性相互作用。将连接了模板蛋白的探针与非印迹材料相互作用也得出同样的结果。证明模板与印迹位点具有特异性亲和力。

生物分子相互作用分析 (biomolecular interaction analysis) 中常使用一种基于表面等离子共振技术 (surface plasmon resonance, SPR) 的生物传感分析技术。实验时先将一种生物分子固定于传感器芯片上,使与之相互作用的另一生物分子甚至是细胞、病毒等的溶液流经该芯片。当两者发生相互作用时,芯片表面溶液会发生折射率的改变,从而引起共振角的变

化, 可实现实时跟踪检测生物分子间结合与解离过程的变化及其相互作用的强弱。Matsunaga 等<sup>[15]</sup>利用分子印迹技术将模板蛋白分子——溶菌酶晶体直接印迹在表面等离子共振芯片上。研究者选择蛋白晶体基于如下考虑: 蛋白晶体的流动性较小而不易变性, 构象与其溶液状态相似。研究人员首先将溶菌酶结晶于纤维素膜表面, 然后将该纤维素膜浸置于含有功能单体丙烯酸、交联剂亚甲基双丙烯酰胺、共聚单体 2-甲基丙烯酰乙基磷酸胆碱、蛋白晶体保护剂聚乙二醇及引发剂过硫酸钾的 pH 7.4 HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) 缓冲液中, 再将一个用双丙烯酰胺预处理过的 SPR 传感器芯片置于纤维素膜上, 于 36 °C 下进行聚合反应, 最后以丙酮溶解除去纤维素膜, 以 1 mol·L<sup>-1</sup> NaCl 溶液洗涤芯片表面残留的蛋白, 即得覆盖有溶菌酶晶体印迹薄膜的传感器芯片。以 SPR 原理检测显示, 溶菌酶印迹的传感器芯片与模板蛋白溶菌酶之间的特异性结合作用显著高于对照蛋白。

**2.2.2 核-壳结构微球/纳米粒 (Core-shell structured microspheres/nanoparticles)** 用预制的微球或纳米粒作为支撑基质, 称为“核”, 其上覆盖印迹材料作为“壳”, 构成“核-壳”结构。模板蛋白可以共价接枝于核上, 也可与材料单体混合后聚合于核上。

Li 等<sup>[16]</sup>将高度交联的壳聚糖微球作为“核”, 通过可逆的席夫碱反应共价连接模板蛋白 BSA, 最后在此多糖-蛋白的界面上通过溶胶-凝胶过程覆盖一层聚硅氧烷的“壳”。用乙酸破坏席夫碱从而将模板蛋白从“核”上脱除, 而“壳”上则将模板的大小、形状及空间构象保留下来。此法制备的微球表面具有较粗糙的多孔结构。扫描电镜图像显示, 印迹微球表面形成大量分布均匀、网状连接的孔穴。BET 氮气吸附实验结果表明, 作为支撑基质的壳聚糖微球 BET 表面积为 41.25 m<sup>2</sup>·g<sup>-1</sup>, 平均孔径为 8.7 nm。而“核-壳”型印迹微球的 BET 表面积为 48.65 m<sup>2</sup>·g<sup>-1</sup>, 平均孔径达 43.2 nm。表面积和孔径的增加提示了印迹位点的形成。

Lee 等<sup>[17]</sup>受贝壳分泌的黏蛋白组分的启发, 研究发现多巴胺可附着并自聚于多种有机或无机材料表面, 形成一层聚多巴胺薄膜。Ouyang 等<sup>[18]</sup>利用该法制备了“核-壳”结构印迹纳米粒。以硅醇基修饰超顺磁性纳米粒为“核”, 多巴胺能吸附于硅醇基上, 在模板蛋白的存在下用过硫酸铵在生理条件下引发多巴胺单体自聚合, 洗脱除去蛋白后, 在纳米粒表面形成了印迹有蛋白的“壳”。此种纳米粒外观圆整,

粒径分布均一。BET 氮气吸附实验结果表明, 印迹纳米粒的表面孔穴总体积远远大于非印迹纳米粒, 且平均孔隙大约为 5 nm, 非常接近模板牛血红蛋白的大小。

Tan 等<sup>[19]</sup>用微乳液聚合法制备超顺磁性亚微粒。预先制备 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 磁性纳米粒, 将功能单体甲基丙烯酸甲酯和交联剂乙二醇二甲基丙烯酸分散在油相中, 用微乳液聚合法制备表面印迹核糖核酸酶 A (ribonuclease A, RNase A) 的亚微粒。与非印迹材料相比, 印迹材料在混合蛋白溶液中对模板蛋白有很好的选择性。

**2.2.3 印迹纳米粒 (Molecularly imprinted nanoparticles)** Hoshino 等<sup>[20]</sup>用沉淀聚合法制备以两性多肽蜂毒肽 (bee toxin melittin, Mel) 为模板的聚合物纳米粒。沉淀聚合法制备条件温和, 材料聚合过程中无需有机试剂或加热过程。由于 Mel 具两性, 倾向于停留在聚合物-水相的界面上, 在此位点上, Mel 既能辅助材料的聚合, 又能在材料上创建与之互补的特异性结合位点, 在一定程度上达到“表面印迹”的效果。这是制备两性生物大分子印迹材料的一种通用方式。但亲水性生物大分子几乎没有停留在两相界面上的可能, 此种方式便不再适用。

该研究小组又选取绿色荧光蛋白 C 端 9 个氨基酸构成的多肽片段作为模板, 用反相微乳液聚合法制备印迹纳米粒<sup>[21]</sup>。考虑到该片段大于 50% 的氨基酸都是亲水性的, 作者对其 N 端进行长链脂肪酸修饰, 将其改性为两性分子, 使之尽可能地停留在油-水界面上。改性后的多肽具有类似表面活性剂的作用, 其亲油的脂肪酸部分可插入油相, 而亲水的多肽部分则朝向水相。如此既有利于模板停留在两相界面上, 又不妨碍模板与水相中的功能单体相互作用进行预聚合。作者认为此法或可成为亲水性多肽表面印迹的通用策略。

此外, 该小组用一种特殊的方式——QCM 来定量测定模板与材料的相互作用。在 QCM 芯片表面固定模板蛋白, 将纳米粒注入样品池中, 通过电极质量增加引起的频率变化来判断蛋白与材料亲和力的强弱。这种方式简便而直接, 可快速进行印迹材料的筛选及表观解离常数的测定。

Tan 等<sup>[22, 23]</sup>以甲基丙烯酸甲酯为功能单体, 乙二醇二甲基丙烯酸为交联剂, 用微乳液 (W/O/W 复乳) 聚合法制备了印迹 RNase A 的纳米粒。该法中使用了较高浓度的 SDS 和聚乙烯醇 (polyvinyl alcohol, PVA)

作为乳化剂。作者认为,当两亲性的蛋白被加入预聚合乳液后,蛋白会吸附于表面活性剂形成的胶束中并被分配到油-水两相的界面上。聚合反应引发后,蛋白便被“束缚”在胶束的表面了。研究表明,蛋白和表面活性剂的相互作用有助于蛋白停留在纳米粒表面,然而太剧烈的作用却会导致蛋白明显的构象变化,甚至变性,造成错误的印迹。

### 2.3 抗原决定簇印迹 (Epitope imprinting)

“抗原决定簇”指的是抗原大分子上能被抗体识别的一小段活性位点。受此启发, Rachkov 等<sup>[24, 25]</sup>开创了“抗原决定簇”印迹法:将蛋白暴露部分的一小段多肽序列作为模板分子进行印迹,得到的材料不仅能识别这段序列,还能与整个蛋白相结合。抗原决定簇印迹法有几个优势<sup>[2]</sup>:首先,小段多肽与单体材料有更强和更具特异性的相互作用,以此减少非特异性吸附并增强材料对模板的亲和力。其次,小段多肽在有机试剂中相对稳定,因而有机试剂也可作为聚合的介质。

Nishino 等<sup>[26]</sup>分别选取细胞色素 c (cytochrome, Cyt c)、BSA 和酒精脱氢酶 (alcohol dehydrogenase, ADH) 末端的九肽序列作为模板制备分子印迹薄膜。目的是在材料上构建目标蛋白“抗原决定簇”的一级结构,而避免涉及复杂的蛋白二级和三级结构。用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 定性检测发现,此种印迹薄膜能从 5 种蛋白的混合溶液中选择性吸附相应的目标蛋白,而对其他蛋白的吸附量均低于检测限。更有趣的是,用仅改变一个氨基酸的伪肽作为模板制备的印迹材料对目标蛋白 BSA 的吸附量明显减少。

用细胞、细菌或病毒表面的某种特征成分,如有机物小分子、多肽、蛋白作为模板,制备能识别整体的印迹材料也是“抗原决定簇”印迹法的一种衍生。Pan 等<sup>[27]</sup>以金葡菌表面特征蛋白 A (*Staphylococcus aureus* protein A, SpA) 为模板蛋白,用反相悬浮聚合法制备了聚丙烯酰胺印迹微球。印迹微球对 3 种不同细菌的选择性结合实验表明,其对目标细菌金葡菌的吸附量可达  $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4$  CFU/g, 远远超出其他两种对照细菌。

然而,有时“抗原决定簇”印迹材料对目标蛋白的结合能力却不如传统的蛋白印迹法。Brown 等<sup>[11]</sup>分别以溶菌酶和溶菌酶的 16 个氨基酸残基构成的多肽片段为模板制备了两种多孔二氧化硅印迹骨架材料。将两种印迹材料分别置于溶菌酶和 RNase A 的混

合溶液中进行蛋白竞争结合实验。结果表明,蛋白印迹材料对模板选择性强,而多肽印迹材料则无选择性。原因可能是:多肽序列的分子量仅是溶菌酶的 12%,很可能在印迹过程中被包埋于材料内部难以脱离,在一定程度上减少了表面印迹位点。另外,将多肽片段代替蛋白印迹于骨架上,限制了蛋白与材料结合时的定向性,即减少了结合的可能性。

### 3 蛋白质分子印迹的应用前景

分子印迹技术发展至今,已取得长足进步。尤其是小分子化合物印迹技术发展成熟,有些已实现了商品化。然而,从近年来对蛋白质印迹材料的研究报道中不难发现,由于蛋白质自身性质复杂,相关研究相对滞后。多数材料的应用价值仅局限于分析化学和生物化学领域,鲜有研究者致力于挖掘其在更多领域的潜能。

Cutivet 等<sup>[28]</sup>首次将分子印迹技术引入酶抑制剂的研究。酶的激动和抑制是调控代谢反应和生物过程的重要手段之一。一些通过化学合成得到的小分子酶抑制剂对靶点缺乏足够的亲和性和选择性,往往导致副作用<sup>[29]</sup>。研究人员将胰蛋白酶抑制剂 4-氨基苯甲脒与单体甲基丙烯酸偶联得到新化合物,该化合物在印迹材料的聚合中可充当模板胰蛋白酶强大的锚定位点。实验表明,分子印迹材料对胰蛋白酶的抑制作用明显超出小分子抑制剂苯甲脒。可见,制备以酶为模板的分子印迹材料为酶抑制剂类药物的设计提供了新思路。

Shea 的研究小组制备了 Mel 印迹纳米粒<sup>[30]</sup>,并首次将其作为解毒剂运用于体内,取得了突破性的进展。体外研究表明,该材料在粒径、对模板的亲和力和选择性方面都堪比天然抗体。后续的小鼠体内实验发现,印迹纳米粒经尾静脉注射后可与 Mel 结合,在进入肝脏后被巨噬细胞摄取,起到解毒的功效。小鼠生存曲线表明,注射了印迹纳米粒的小鼠存活率远高于其对照组。且细胞实验和组织病理学切片证明材料无明显毒性和免疫原性。

事实上,分子印迹材料与模板蛋白的结合非常类似天然抗原-抗体或配体-受体的结合,且具有更好的物理和化学稳定性。一旦发展成熟,可利用其特异性识别功能,作为“人工抗体”或“人工受体”运用于新型药物靶向传释系统中,取代蛋白或多肽类靶向头基,在体内与对应的靶点发生特异性结合,实现药物的主动靶向传递。当然,蛋白质分子印迹技术的发展还有很长的路要走,相信通过研究人员的不懈努力一定会开创更广阔的应用前景。

## References

- [1] Bergmann NM, Peppas NA. Molecularly imprinted polymers with specific recognition for macromolecules and proteins [J]. *Prog Polym Sci*, 2008, 33: 271–288.
- [2] Ge Y, Turner APF. Too large to fit? Recent developments in macromolecular imprinting [J]. *Trends Biotechnol*, 2008, 26: 218–224.
- [3] Janiak DS, Kofinas P. Molecular imprinting of peptides and proteins in aqueous media [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2007, 389: 399–404.
- [4] Bossi A, Bonini F, Turner APF, et al. Molecularly imprinted polymers for the recognition of proteins: the state of the art [J]. *Biosens Bioelectron*, 2007, 22: 1131–1137.
- [5] Kubo T, Hosoya K, Nomachi M, et al. Preparation of a novel molecularly imprinted polymer using a water-soluble crosslinking agent [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2005, 382: 1698–1701.
- [6] Vlatakis G, Andersson LI, Müller R, et al. Drug assay using antibody mimics made by molecular imprinting [J]. *Nature*, 1993, 361: 645–647.
- [7] Wang XJ, Xu ZL, Yang ZG, et al. Molecular recognition in aqueous media with molecular imprinting technique [J]. *Prog Chem (化学进展)*, 2007, 19: 805–812.
- [8] Hawkins DM, Trache A, Ellis EA, et al. Quantification and confocal imaging of protein specific molecularly imprinted polymers [J]. *Biomacromolecules*, 2006, 7: 2560–2564.
- [9] Ye L, Mosbach K. Molecular imprinting: synthetic materials as substitutes for biological antibodies and receptors [J]. *Chem Mater*, 2008, 20: 859–868.
- [10] Qin L, He XW, Zhang W, et al. Macroporous thermosensitive imprinted hydrogel for recognition of protein by metal coordinate interaction [J]. *Anal Chem*, 2009, 81: 7206–7216.
- [11] Brown ME, Puleo DA. Protein binding to peptide-imprinted porous silica scaffolds [J]. *Chem Eng J*, 2008, 137: 97–101.
- [12] Tan CJ, Tong YW. Molecularly imprinted beads by surface imprinting [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2007, 389: 369–376.
- [13] El Kirat K, Bartkowski M, Haupt K. Probing the recognition specificity of a protein molecularly imprinted polymer using force spectroscopy [J]. *Biosens Bioelectron*, 2009, 24: 2618–2624.
- [14] Su WX, Rick J, Chou TC. Selective recognition of ovalbumin using a molecularly imprinted polymer [J]. *Microchem J*, 2009, 92: 123–128.
- [15] Matsunaga T, Takeuchi T. Crystallized protein-imprinted polymer chips [J]. *Chem Lett*, 2006, 35: 1030–1031.
- [16] Li F, Li J, Zhang SS. Molecularly imprinted polymer grafted on polysaccharide microsphere surface by the sol-gel process for protein recognition [J]. *Talanta*, 2008, 74: 1247–1255.
- [17] Lee H, Dellatore SM, Miller WM, et al. Mussel-inspired surface chemistry for multifunctional coatings [J]. *Science*, 2007, 318: 426–430.
- [18] Ouyang RZ, Lei JP, Ju HX. Artificial receptor-functionalized nanoshell: facile preparation, fast separation and specific protein recognition [J]. *Nanotechnology*, 2010, 21: 1–9.
- [19] Tan CJ, Tong YW. Preparation of superparamagnetic ribonuclease A surface-imprinted submicrometer particles for protein recognition in aqueous media [J]. *Anal Chem*, 2007, 79: 299–306.
- [20] Hoshino Y, Kodama T, Okahata Y, et al. Peptide imprinted polymer nanoparticles: a plastic antibody [J]. *J Am Chem Soc*, 2008, 130: 15242–15243.
- [21] Zeng ZY, Hoshino Y, Rodriguez A, et al. Synthetic polymer nanoparticles with antibody-like affinity for a hydrophilic peptide [J]. *ACS Nano*, 2010, 4: 199–204.
- [22] Tan CJ, Tong YW. The effect of protein structural conformation on nanoparticle molecular imprinting of ribonuclease A using miniemulsion polymerization [J]. *Langmuir*, 2007, 23: 2722–2730.
- [23] Tan CJ, Wangrangsimakul S, Bai R, et al. Defining the interactions between proteins and surfactants for nanoparticle surface imprinting through miniemulsion polymerization [J]. *Chem Mater*, 2008, 20: 118–127.
- [24] Rachkov A, Minoura N. Towards molecularly imprinted polymers selective to peptides and proteins. The epitope approach [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2001, 1544: 255–266.
- [25] Rachkov A, Hu MJ, Bulgarevich E, et al. Molecularly imprinted polymers prepared in aqueous solution selective for [Sar<sup>1</sup>, Ala<sup>8</sup>]angiotensin II [J]. *Anal Chim Acta*, 2004, 504: 191–197.
- [26] Nishino H, Huang CS, Shea KJ. Selective protein capture by epitope imprinting [J]. *Angew Chem (Int Ed Engl)*, 2006, 45: 2392–2396.
- [27] Pan J, Xue XH, Wang JH, et al. Recognition property and preparation of *Staphylococcus aureus* protein A-imprinted polyacrylamide polymers by inverse-phase suspension and bulk polymerization [J]. *Polymer*, 2009, 50: 2365–2372.
- [28] Cutivet A, Schembri C, Kovensky J, et al. Molecularly imprinted microgels as enzyme inhibitors [J]. *J Am Chem Soc*, 2009, 131: 14699–14702.
- [29] Sellergren B. Molecularly imprinted polymers: shaping enzyme inhibitors [J]. *Nat Chem*, 2010, 2: 7–8.
- [30] Hoshino Y, Koide H, Urakami T, et al. Recognition, neutralization, and clearance of target peptides in the bloodstream of living mice by molecularly imprinted polymer nanoparticles: a plastic antibody [J]. *J Am Chem Soc*, 2010, 132: 6644–6645.