



## 牛血清白蛋白分子印迹壳聚糖树脂的制备

高 婷, 郭敏杰, 樊 志, 郭艳玲  
(天津科技大学理学院, 天津 300457)

**摘要:** 以酰基化的壳聚糖树脂为载体, 丙烯酰胺为功能单体,  $N,N'$ -亚甲基双丙烯酰胺为交联剂, 在模板分子牛血清白蛋白(BSA)存在下, 采用直接滴加成球法, 制备出对牛血清白蛋白具有特异识别性能的分 子印迹聚合物. 对 BSA 的 吸附过程进行 Langmuir 等温吸附模型的数据处理. 结果表明, 印迹聚合物对模板蛋白的最大吸附量为 11.1 mg/g, Langmuir 等温吸附平衡常数为 8.19 mL/mg.

**关键词:** 壳聚糖; 牛血清白蛋白; 分子印迹

中图分类号: O658.19; O641.13 文献标志码: A 文章编号: 1672-6510(2010)01-0020-04

## Molecular Imprinting Polymer Made of Chitosan for BSA

GAO Ting, GUO Min-jie, FAN Zhi, GUO Yan-ling  
(College of Science, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

**Abstract:** Molecularly imprinted polymer bead was prepared by using bovine serum albumin(BSA) as the template, acylated chitosan resin as the supporting matrix, acrylamide as the functional monomer and  $N,N'$ -methylenebisacrylamide as crosslinker. The Langmuir isotherm was used to characterize the absorption of BSA, it was shown that the maximum adsorption capacity to template BSA was 11.1 mg/g and Langmuir adsorption equilibrium constant was 8.19 mL/mg.

**Keywords:** chitosan; BSA; molecular imprinting

制备蛋白质印迹聚合物的最简单方法是利用非共价作用<sup>[1]</sup>, 主要有包埋法<sup>[2]</sup>和表面印迹法<sup>[3]</sup>. 使用包埋法印迹蛋白质存在的主要问题是分子在高度交联的聚合物网络中流动性差、可逆性差、结合效率低、印迹分子不易洗脱、有效尺寸的聚合物收率低等<sup>[4]</sup>. 由于要保持聚合后蛋白质大分子生物活性和空间构象, 印迹蛋白质通常采用表面印迹法. 表面印迹法<sup>[5]</sup>制得的介质使印迹识别位点处在颗粒的表面(或表层), 由于表面印迹法使用的载体具有较大的表面积, 使目标分子更易接近印迹点. 因此, 近年来表面印迹蛋白质的方法研究较多, 也最具发展前途和应用前景.

壳聚糖是一种生物相容性好、原料丰富的天然多糖, 壳聚糖载体和蛋白质体系有着天然的相容性, 壳聚糖有着较大的吸附容量, 因此常将壳聚糖或者改性后壳聚糖作为印迹聚合物的载体, 应用于印迹蛋白质

分子的研究<sup>[5-8]</sup>. 另外, 若能将壳聚糖与分子印迹技术相结合, 将无序的作用力转变为利用特定功能基团进行有序识别的结合位点, 则可以提高其吸附的选择性. 本文以酰基化的壳聚糖树脂为载体, 丙烯酰胺为功能单体, 以  $N,N'$ -亚甲基双丙烯酰胺为交联剂, 在模板分子牛血清白蛋白存在下, 采用直接滴加成球法, 制备出对牛血清白蛋白具有特异识别性能的分 子印迹聚合物.

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

壳聚糖, 上海伯奥生物科技公司;  $N,N'$ -亚甲基双丙烯酰胺(MBA)、过硫酸钾( $K_2S_2O_8$ )、亚硫酸氢钠, 天津市北方天医化学试剂厂; 牛血清白蛋白, 天津博

收稿日期: 2009-07-10; 修回日期: 2009-10-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(20704031); 天津市自然科学基金资助项目(09JCYBJC06300)

作者简介: 高 婷(1985—), 女, 天津人, 硕士研究生; 通信作者: 郭敏杰, 副教授, guomj@tust.edu.cn.

美科生物技术有限公司;丙烯酰胺(AM)、乙酸、*N,N'*-二甲基甲酰胺(DMF),天津化学试剂三厂;丙烯酰氯(AC),北京腾达科技有限公司。

紫外可见分光光度计,北京普析通用仪器有限责任公司;VECTOR-22型傅里叶变换红外光谱仪,布鲁克仪器公司。

## 1.2 壳聚糖树脂的制备

称取 5.0 g 壳聚糖,加入到 100 mL 体积分数为 2%的醋酸溶液中,充分搅拌使其完全溶解,静置 12 h 使其消泡。用 7 号标准针头把制得的壳聚糖醋酸溶液分别打入 2 mol/L 和 2.5 mol/L 的 200 mL NaOH 溶液中,溶液中会瞬间形成凝胶小球。所形成的壳聚糖树脂保留在 NaOH 溶液中 24 h 后,用蒸馏水冲洗并保存在蒸馏水中待用。分别记作 Cs-2M 和 Cs-2.5M。

## 1.3 壳聚糖树脂的酰基化

称取上述制得的壳聚糖树脂(用过滤器除掉树脂表面的水)4.0 g,浸泡在 10 mL DMF 中,在 4 °C 条件下逐滴加入 4 mL AC,室温条件下反应 4 h。将反应后的树脂用 2 mol/L NaOH 溶液冲洗并保存在蒸馏水中待用,记作 Cs-Ac。

## 1.4 牛血清白蛋白分子印迹聚合物的制备

称取上述酰基化壳聚糖树脂 4.0 g, AM 1.0 g, MBA 0.16 g,  $K_2S_2O_8$  0.3 g, BSA 160 mg, 去离子水 7 mL。混合物在氮气环境下连续搅拌 45 min, 然后加入 0.16%的  $NaHSO_3$  水溶液 5 mL。混合物在氮气保护下,在冰水浴中搅拌 2 h。将产物放入尼龙袋里挤压除掉聚丙烯酰胺凝胶。将剩下的壳聚糖树脂用体积分数为 10%乙酸溶液(含 10 g/L SDS)与 2 mol/L 的氯化钾溶液反复冲洗多次,使其紫外吸收分光光度计在 278 nm 处无吸收峰为止。然后树脂用 0.01 mol/L 的磷酸二氢钠缓冲溶液(pH 6.8)处理 24 h 待用,在这里用 MIP-Ac 表示。

## 1.5 印迹壳聚糖树脂吸附量的测定

分别称取湿重的非印迹壳聚糖树脂(MIP-blank)0.5 g、在 2 mol/L NaOH 溶液中成球的印迹壳聚糖树脂(MIP-2M)0.5 g 和印迹酰基化壳聚糖树脂(MIP-Ac)0.5 g,分别放入 50 mL 锥形瓶中,再分别加入 25 mL 0.500 mg/mL 的 BSA 溶液,在 4 °C 下振荡吸附 17 h。用紫外分光光度计测量 BSA 在 278 nm 处吸光度,考察蛋白质的吸附情况。

## 1.6 印迹壳聚糖树脂的等温吸附

Langmuir 吸附方程<sup>[9]</sup>如下所示:

$$\frac{c_e}{Q_e} = \frac{c_e}{Q_{\max}} + \frac{1}{b \times Q_{\max}} \quad (1)$$

式中: $c_e$  为吸附平衡时溶液中 BSA 质量浓度(mg/mL); $Q_e$  为吸附平衡时印迹壳聚糖树脂对 BSA 的吸附量(mg/g); $Q_{\max}$  为印迹壳聚糖树脂对 BSA 的最大吸附量(mg/g); $b$  为 Langmuir 吸附平衡常数(mL/mg)。根据  $c_e/Q_{\max}$  对  $c_e$  作图,得到印迹壳聚糖树脂的 Langmuir 吸附等温线。

## 2 结果与讨论

### 2.1 成球条件的确定

#### 2.1.1 壳聚糖浓度的影响

实验表明,壳聚糖溶液的浓度对成球有较大的影响(见表 1)。当壳聚糖溶液质量浓度低于 0.2 mg/mL 时,不能形成很好的球形,且球的机械强度很差;壳聚糖溶液质量浓度大于 0.5 mg/mL 时,成球率在 99.2% 以上,强度很高。

表 1 壳聚糖溶液的质量浓度对壳聚糖成形的影响

Tab.1 Effect of the concentration of chitosan solution on the preparation of chitosan resin

壳聚糖质量浓度/(mg·mL <sup>-1</sup> )	成球率/%	粒径/mm	强度
0.2	—	—	—
0.3	94.7	0.730	一般
0.4	98.5	0.940	好
0.5	99.2	1.010	很好

#### 2.1.2 NaOH 浓度的影响

在滴加成球实验过程中,随着 NaOH 溶液浓度从 2.0 mol/L 降低到 0.5 mol/L,树脂的粒径逐渐增大(表 2),从 0.798 mm 增加到 2.015 mm。实验将制备壳聚糖树脂成形时的 NaOH 溶液浓度控制在 2.0 mol/L,并使用该浓度下成形的壳聚糖树脂进行蛋白质印迹实验。

表 2 NaOH 溶液的浓度对壳聚糖成形的影响

Tab.2 Effect of the concentration of NaOH solution on the preparation of chitosan resin

NaOH 浓度/(mol·L <sup>-1</sup> )	粒径/mm
2.0	0.798
1.0	0.984
0.5	2.015

### 2.2 酰基化壳聚糖树脂的红外光谱分析

通过对比壳聚糖树脂接枝前后的傅里叶红外谱图(见图 1),酰基化后的壳聚糖树脂在 1 680 cm<sup>-1</sup> 附近出现了明显的吸收峰,该吸收峰为碳碳双键的振动吸收峰,证明在壳聚糖树脂表面成功引入了双键。

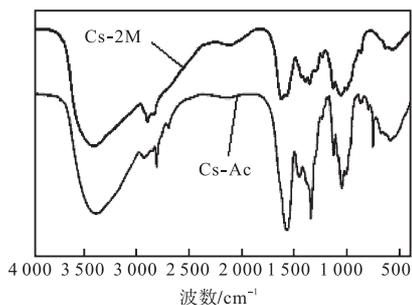


图1 Cs-2M和Cs-Ac的红外光谱分析图  
Fig.1 FTIR spectrum of Cs-2M and Cs-Ac

2.3 壳聚糖树脂对蛋白质吸附的红外光谱分析

在壳聚糖的 FTIR 图谱(见图 2)中,1 651 cm<sup>-1</sup> 是氨基的吸收谱带,在 3 444 cm<sup>-1</sup> 的吸收是 O—H 与 N—H 的伸缩振动吸收峰重叠而成的多重吸收峰. 壳聚糖吸附牛血清白蛋白后,该重叠峰位移由 3 444 cm<sup>-1</sup> 改变为 3 418 cm<sup>-1</sup>,体现为向短波移动,说明—OH 可能对吸附有贡献. 而 1 651 cm<sup>-1</sup> 处氨基的位移没有明显变化,但相对强度发生了较大改变,说明壳聚糖的氨基可能是壳聚糖吸附蛋白质的位点.

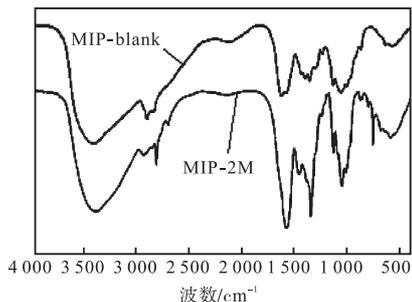


图2 MIP-blank和MIP-2M的红外光谱分析图  
Fig.2 FTIR spectrum of MIP-blank and MIP-2M

2.4 印迹壳聚糖树脂吸附量的测定

以 MIP-Ac 壳聚糖微球为例:质量浓度为 0.500 mg/mL BSA 溶液,被 MIP-Ac 壳聚糖树脂吸附后,使用紫外分光光度计测定其吸光度为 0.240,根据蛋白质标准曲线(见图 3),计算出溶液中蛋白质的质量浓度为 0.404 mg/mL.

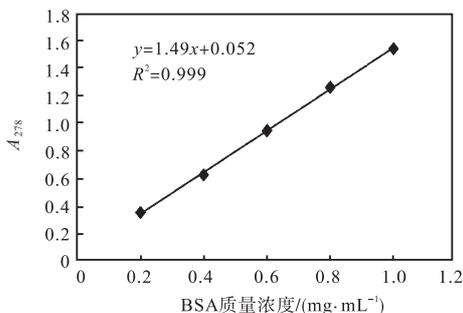


图3 蛋白质标准曲线  
Fig.3 Standard curve of BSA

设单位吸附量为  $Q$

$$Q = \frac{(c_0 - c) \times V}{m} \quad (2)$$

式中: $Q$  为单位吸附量; $c_0$  为蛋白质原液的质量浓度; $c$  为吸附后溶液中蛋白质的质量浓度; $V$  为所取蛋白质溶液的体积; $m$  为所取壳聚糖微球的湿质量. 通过计算得到的印迹壳聚糖树脂的吸附率见表 3.

表3 印迹壳聚糖树脂的吸附率

Tab.3 Reproducibility of MIP-blank, MIP-2M and MIP-Ac

样品	$c/(mg \cdot mL^{-1})$	吸附量/( $mg \cdot g^{-1}$ )		吸附率/%
		第1次	第2次	
MIP-blank	0.5	1.12	0.25	22.3
MIP-2M	0.5	3.30	1.51	45.7
MIP-Ac	0.5	5.25	4.80	91.4

2.5 印迹壳聚糖树脂吸附等温线

在相同条件下测定了改性印迹壳聚糖树脂 MIP-Ac、印迹壳聚糖树脂 MIP-2M 与未印迹壳聚糖树脂 MIP-blank 对模板蛋白的吸附等温线. 由图 4 可以看出,印迹壳聚糖树脂的吸附量要大于未印迹壳聚糖树脂,并且将壳聚糖树脂进行酰基化之后,能明显提高印迹壳聚糖树脂对 BSA 的吸附量. 未印迹的壳聚糖树脂对 BSA 的吸附量随着溶液中蛋白质浓度的增加趋于平衡,这一现象符合简单的物理吸附的规律. 但印迹的壳聚糖树脂对 BSA 的吸附量与溶液中蛋白质浓度呈线性增长的关系,说明在壳聚糖树脂上形成了与 BSA 的空间结构和识别基团相匹配的识别位点.

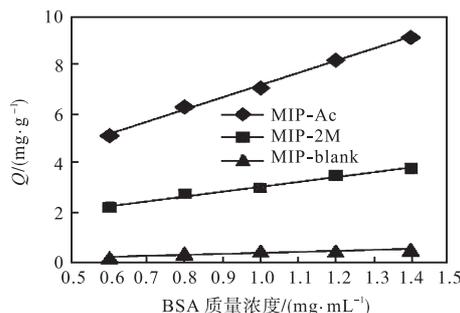


图4 印迹聚合物吸附等温线  
Fig.4 Adsorption isotherms of MIP-Ac, MIP-2M and MIP-blank

2.6 印迹壳聚糖树脂的 Langmuir 吸附方程

印迹壳聚糖树脂的 Langmuir 吸附等温线如图 5 所示. 从图 5 中可以得出  $Q_{max}$  和  $b$ , 其具体数值见表 4, 可以看出酰基化后的壳聚糖树脂的吸附量明显增加.

印迹壳聚糖树脂与 BSA 之间的相互作用对吸附是否有利可以根据特征分离系数  $R_L$  的大小来判断,

其中  $R_L=1/(1+b \times c_0)$ .  $R_L > 1$  时表明印迹壳聚糖树脂与 BSA 之间的相互作用不利于吸附,  $0 < R_L < 1$  时表明印迹壳聚糖树脂与 BSA 之间的相互作用利于吸附<sup>[10]</sup>. 从表 5 可以看出印迹壳聚糖树脂与 BSA 之间的相互作用有利于吸附.

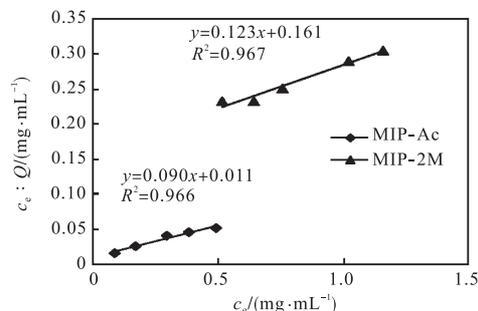


图 5 印迹壳聚糖树脂的 Langmuir 吸附等温线

Fig.5 Langmuir isotherms BSA adsorption on MIP-Ac and MIP-2M

表 4 印迹壳聚糖树脂的 Langmuir 吸附平衡常数

Tab.4 Langmuir isotherm constants of MIP-Ac and MIP-2M

印迹聚合物	$Q_{max}/(\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$	$b/(\text{mL} \cdot \text{mg}^{-1})$
MIP-2M	8.13	0.76
MIP-Ac	11.1	8.19

表 5 印迹壳聚糖树脂的 Langmuir 特征分离系数

Tab.5  $R_L$  values based on the Langmuir equation

BSA/ $(\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$	$R_L$	
	MIP-2M	MIP-Ac
0.6	0.687	0.169
0.8	0.622	0.132
1.0	0.568	0.109
1.2	0.523	0.092
1.4	0.484	0.080

### 3 结论

利用酰基化的壳聚糖树脂制备的牛血清白蛋白分子印迹聚合物,对模板分子具有特异识别性,并且表现出明显的吸附效率,酰基化的壳聚糖树脂的最大吸附量可以达到 11.1 mg/g. 这种特异性分子印迹介质的制备为分离提纯特种结合蛋白提供了一种优良的方法,在分离提纯领域将得到越来越广泛的应用. 该法将为多肽、蛋白质等生物大分子的有效分离提供

一种新的途径.

### 参考文献:

- [1] Vlatakis G, Andersson L I, Müller R, et al. Drug assay using antibody mimics made by molecular imprinting[J]. Nature, 1993, 361 (6413): 645-647.
- [2] SHI Huai-qiu, Tsai W B, Garrison M D, et al. Template-imprinted nanostructured surfaces for protein recognition[J]. Nature, 1999, 398 (6728): 593-597.
- [3] Yoshida M, Hatate Y, Uezu K, et al. Chiral-recognition polymer prepared by surface molecular imprinting technique[J]. Colloids Surfaces A, 2000, 169 (1-3): 259-269.
- [4] 郭天瑛, 夏永清. 蛋白质分子印迹技术的研究进展[J]. 化工进展, 2003, 22 (7): 713-716.
- [5] XIA Yong-qing, GUO Tian-ying, SONG Mou-dao, et al. Hemoglobin recognition by imprinting in semi-interpenetrating polymer network hydrogel based on polyacrylamide and chitosan[J]. Biomacromolecules, 2005, 6 (5): 2601-2606.
- [6] FU Guo-qi, ZHAO Ji-chao, YU Hao, et al. Bovine serum albumin-imprinted polymer gels prepared by graft copolymerization of acrylamide on chitosan[J]. Reactive & Functional Polymers, 2007, 67 (5): 442-450.
- [7] Mohajeri S A, Ebrahimi S A. Preparation and characterization of a lamotrigine imprinted polymer and its application for drug assay in human serum[J]. J Sep Sci, 2008, 31 (20): 3595-3602.
- [8] XI Feng-na, WU Jian-min. Preparation of macroporous chitosan layer coated on silica gel and its application to affinity chromatography for trypsin inhibitor purification[J]. Reactive & Functional Polymers, 2006, 66 (6): 682-688.
- [9] GUO Tian-ying, XIA Yong-qing, JIN Wang, et al. Chitosan beads as molecularly imprinted polymer matrix for selective separation of proteins[J]. Biomaterials, 2005, 26 (28): 5737-5745.
- [10] 卢春阳, 王华芳, 何锡文, 等. 杯芳烃衍生物和丙烯酰胺作为复合功能单体的分子印迹聚合物对海因类化合物的选择性识别研究[J]. 高等学校化学学报, 2005, 26 (10): 1820-1824.