

分子印迹磁性荧光复合微球的制备及其性能研究

罗爱芹, 陈炜杰, 张鑫, 刘红阳, 李园园, 孙立权

(北京理工大学 生命学院, 北京 100081)

摘要: 复杂生物体系中蛋白质的高效分离分析在生物分离、蛋白质纯化与检测等生命科学研究领域中具有重要的意义. 本文以磁性荧光复合微球(Fe_3O_4 MNP-ZnSQDs)为载体, 利用表面印迹技术在 Fe_3O_4 MNP-ZnSQDs 表面构建“核-壳”结构的磁性荧光蛋白印迹微球(Fe_3O_4 MNP-ZnSQD@MIPs), 并用于溶菌酶蛋白的快速分离. 结果表明, 制备的 Fe_3O_4 MNP-ZnSQD@MIPs 具有分散性好、粒径均一、荧光发射强、磁响应明显等特点. 在最优条件下, 该印迹微球在 15 min 达到吸附平衡, 最大吸附容量可达 $645.76 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 饱和磁强度为 $40 \text{ emu} \cdot \text{g}^{-1}$, 且具有良好的选择性, 印迹因子为 2.15. 该磁性荧光分子印迹微球成本低、耗时短、使用简单、吸附量高且选择性好, 可用于大批量样品检测中溶菌酶的快速分离与纯化.

关键词: 分子印迹; 磁性荧光复合微球; 蛋白质分离

中图分类号: O657.3

文献标志码: A

文章编号: 1001-0645(2020)10-1126-07

DOI: 10.15918/j.tbit.1001-0645.2019.112

Preparation and Properties of Molecularly Imprinted Magnetic Fluorescent Composite Microspheres

LUO Ai-qin, CHEN Wei-jie, ZHANG Xin, LIU Hong-yang, LI Yuan-yuan,
SUN Li-quan

(School of Life, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081, China)

Abstract: Rapid and effective separation of protein in complex biological samples is very important in the field of life science research, such as biological separation, protein purification and so on. In this study, Fe_3O_4 MNP-ZnSQDs were used as carriers, and lysozyme was chosen as template protein. The molecularly imprinted polymer was coated on the surface of the Fe_3O_4 MNP-ZnSQDs to form magnetic fluorescent micro-spheres via surface imprinting process. The experiment results show that Fe_3O_4 MNP-ZnSQD@MIPs possesses better dispersibility, uniform particle size and strong fluorescence emission, which can be rapidly separated under external magnetic field. Under optimum conditions, the adsorption equilibrium of Fe_3O_4 MNP-ZnSQD@MIPs can be achieved in 15 minutes, and the maximum adsorption capacity is $645.76 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, the saturation magnetic intensity is $40 \text{ emu} \cdot \text{g}^{-1}$. Moreover, the prepared Fe_3O_4 MNP-ZnSQD @ MIPs possesses adsorption selectivity, and the imprinting factor is 2.15. The advantages of the prepared Fe_3O_4 MNP-ZnSQD @ MIPs include low cost, fast analysis process, convenience and large adsorption capacity. It can be used for rapid separation and purification of lysozyme in complex biological sample.

Key words: molecularly imprinted technology; magnetic fluorescent nano-spheres; protein separation

收稿日期: 2019-04-04

作者简介: 罗爱芹(1965—), 女, 教授, E-mail: bitluo@bit.edu.cn.

磁性纳米粒子(magnetite nanoparticle, MNP)作为一种重要的纳米材料广泛应用于生物分离、蛋白质纯化、药物靶向运输等领域^[1]. 通过外加磁场, MNP可以很好地实现目标分析物的分离富集, 避免传统的离心或过滤等操作带来的不便和误差. 将MNP用于分离纯化蛋白质时, 可以有效地简化操作过程, 避免在分离过程中引起蛋白质结构改变造成的蛋白质失活, 减少样品处理过程中不必要的损失^[2-4]. 量子点(quantum dot, QD)是一种由硒化镉、硫化镉、硫化锌、砷化镉等无机化合物组成的半导体晶体材料, 它具有规则的晶体结构与强荧光发射, 由于尺寸不同, QD具有不同波长的荧光发射, 在生物医学成像、荧光标记、生物传感等领域具有巨大的优势^[5-7]. 分子印迹技术(molecularly imprinting technology, MIT)是通过功能单体、交联剂和模板分子的结合, 模拟抗原-抗体分子间识别, 制备可以与模板分子在空间、结构和大小上特异识别结合的聚合物(molecularly imprinted polymers, MIPs)的一种技术^[8-10]. 溶菌酶(Lysozyme, Lyz, 14.4 kDa)是一种小分子单链蛋白质, 它能够溶解破坏多种细菌细胞壁以达到杀菌作用, 广泛存在于动植物、微生物与人体多种组织中. 机体异常水平的Lyz含量往往意味着一些疾病的发生, 如干眼症、肾病、脑膜炎等^[11]. 由于其临床意义, Lyz高效分离检测在生化分析、医学检测中具有重要的作用. 传统的Lyz分离检测方法主要有酶联免疫吸附法、高效液相色谱法、质谱法、近红外光谱法、毛细管凝胶电泳法等. 这些技术虽然很好地实现了生物样品中Lyz的分析检测, 但是在实际操作中, 这些方法需要精密昂贵的仪器及复杂的样品前处理过程, 消耗了大量的时间和成本^[12-18]. 针对这一问题, 人们将分子印迹技术引入了Lyz检测^[19-20], 例如, Wang等利用表面印迹技术制备了磁性离子液体分子印迹聚合物并应用于Lyz的分离, 吸附量为 $108 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 平衡时间2.5 h, 印迹因子2.02; Xu等以深部共晶溶剂为功能单体, 制备了磁性分子印迹微球应用于Lyz的识别, 吸附量为 $108 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 平衡时间24 h, 印迹因子2.08.

本文设计合成了 Fe_3O_4 MNP-ZnSQDs, 并利用分子印迹技术将Lyz蛋白印迹微球层包覆在 Fe_3O_4 MNP-ZnSQDs上形成“核-壳”结构的印迹微球, 用于Lyz的高效分离纯化, 并对制备的材料进行了结构表征和分离性能考察. 构建的印迹微球对Lyz的分离纯化可通过操纵磁场直接完成, 避免了繁琐的样

品处理和分离过程, 相比于离心、过滤、膜分离等方法, 具有操作简单、快速和高效分离的优点. 在对Lyz的分离吸附能力上, 相对于已报导文献^[19-27], 本文制备的磁性荧光分子印迹微球具有更快的吸附速率与更大的吸附量, 同时兼具磁性荧光双功能, 具有在荧光标记、靶向药物递送、生物传感等研究领域的应用潜力.

1 实验部分

1.1 仪器、试剂与材料

溶菌酶(Lyz, MW 14.4 kDa, pI 11.2, ultra-pure)、辣根过氧化物酶(HRP, MW 40 kDa, pI 7.2, 98%)、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、 β -巯基乙醇(MEA)购自中国上海麦克林生化科技有限公司; 卵清白蛋白(OVA, MW 45 kDa, pI 4.7, 98%)、人血清白蛋白(HSA, MW 66 kDa, pI 4.64, 99.5%)购自中国原叶生物有限公司; 聚-异丙基丙烯酰胺(NIPAAm)购自比利时Acros Organics公司; 丙烯酰胺(AAm)、N,N'-亚甲基双丙烯酰胺(MBA)、九水合硫化钠($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$)、四水合氯化锰($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)购自中国天津光复精细化工研究所; 四甲基乙二胺(TEMED)于中国北京梦怡美生物科技有限公司购买; 六水合氯化铁($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)购自中国天津市福晨化学试剂厂; 柠檬酸三钠、柠檬酸、过硫酸铵(APS)、七水合硫酸锌($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)、乙二醇购自中国北京化工厂; 无水乙酸钠购自中国北京市通广精细化工公司; 鸡蛋购自当地市场. 以上试剂除有特别说明外均为分析纯, 实验用水均为去离子水.

紫外分光光度计(UV-1800, 岛津仪器有限公司, 日本); 荧光分光光度计(RF-5310, 岛津仪器有限公司, 日本); 高分辨透射电子显微镜(JEM-2100, JEOL公司, 日本); 磁学性质测量系统(MPMS-XL-7, Quantam Design公司, 美国); 真空冷冻干燥器(LGJ-10, 松源华兴科技发展有限公司, 北京), 高速离心机(TG16-11, 长沙平凡仪器仪表有限公司, 中国); 电热恒温鼓风干燥箱(DH101-1BS, 天津市中环实验电炉有限公司, 中国); 超声波清洗器(KQ5200, 昆山市超声仪器有限公司, 中国).

1.2 Fe_3O_4 MNP-ZnSQDs的制备

本文分别合成了羧基修饰的四氧化三铁磁性纳米颗粒(Fe_3O_4 MNPs@COOH)和硫化锌量子点(ZnSQDs)^[15-16]. 在此基础上, 进行了量子点表面氨基修饰, 主要过程为: 称取200 mg ZnSQDs、150 mg

MEA 加入 50 mL 锥形瓶中,室温下避光搅拌修饰 10 h;产物即氨基修饰后 ZnSQDs (ZnSQDs @NH₂),离心,收集沉淀,真空冷冻干燥保存备用。

Fe₃O₄MNP-ZnSQDs 采用如下化学手段制备:称取 20 mg Fe₃O₄ MNPs@COOH,加入 20 mL 柠檬酸-柠檬酸三钠缓冲溶液(0.02 mol/L, pH=6.4,下同)配制成 1 mg·mL⁻¹的羧基磁流体;取 2 mL 羧基磁流体,加入 EDC 浓度为 4 mg·mL⁻¹、NHS 浓度为 4.8 mg·mL⁻¹的活化试剂 50 mL,搅拌 2 h;向上述溶液中加入 25 mg ZnSQDs@NH₂,超声分散,在 30 ℃下搅拌反应 20 h. 磁分离收集沉淀,真空冷冻干燥后置于冰箱保存备用。

1.3 Fe₃O₄MNP-ZnSQD@MIPs 的制备

利用表面印迹技术,在 Fe₃O₄MNP-ZnSQDs 表面构建溶菌酶分子印迹微球层,从而获得具有“核-壳”结构的 Fe₃O₄MNP-ZnSQD@MIPs. 制备过程:称取 20 mg Fe₃O₄MNP-ZnSQDs 分散在 5 mL 的柠檬酸-柠檬酸三钠缓冲溶液中,得到磁流体;量取 5 mL 柠檬酸-柠檬酸三钠缓冲溶液置于 50 mL 锥形瓶中,分别加入 6 mg AAM、20 mg NIPAAm、6 μL MAA、5 mg MBA 和 5 mg Lyz 进行预聚合;在预聚合溶液中加入磁流体、100 μL vol-30% TEMED 溶液和 20 μL wt-10% APS 溶液,混合物在氮气保护下反应 24 h;将反应后的混合物进行磁分离并收集沉淀,此沉淀即为 Fe₃O₄MNP-ZnSQD@MIPs 产物. 将该产物浸泡在 vol-10% 乙酸-乙腈溶液中反复清洗,直至其紫外吸光度稳定,即完成模板蛋白洗脱. 作为对照,非印迹微球(Fe₃O₄MNP-ZnSQD@NIPs)的制备过程除不添加 Lyz 外,其他均相同. 洗脱获得的产物磁分离后真空冷冻干燥,置于冰箱保存备用。

1.4 吸附平衡时间的测定

分别取一定量的 Fe₃O₄MNP-ZnSQD@MIPs 与 Fe₃O₄MNP-ZnSQD@NIPs 加入到柠檬酸-柠檬酸三钠缓冲液中,超声分散,配制成 0.1 mg·mL⁻¹的溶液备用. 各取 5 mL 样品溶液,测定 281 nm 处的紫外吸光度,记为初始紫外吸光度 A₀. 将 Lyz 分别加入样品溶液中,配制成浓度为 200 μg·mL⁻¹的溶液. 每隔 5 min 测定一次溶液的紫外吸光度,记为 A. 计算吸附平衡时间和吸附量 Q

$$Q = [m_1 - VK(A - A_0)]/m_2, \quad (1)$$

式中:A 为测得的紫外吸光度;A₀ 为初始溶液中紫外吸光度;V 为溶液体积;K 为 Lyz 标准曲线斜率;

m₁ 为 Lyz 初始质量;m₂ 为 MIP/NIP 的质量。

1.5 吸附等温线的测定

在缓冲溶液中分别加入一定量 Fe₃O₄MNP-ZnSQD@MIPs 与 Fe₃O₄MNP-ZnSQD@NIPs,并使溶液中 Lyz 浓度分别为 0,100,200,300,400,500,600 μg·mL⁻¹. 将不同 Lyz 浓度的样品充分混匀后吸附 15 min,磁分离后测定上清液的紫外吸光度,用式(2)计算它们的最大吸附量 Q_{max}. 采用 Langmuir 和 Freundlich 模型来判断吸附行为,实验结果拟合表明,Langmuir 模型更符合实验测定的吸附量与 Lyz 的浓度的变化关系. Langmuir 模型方程为

$$Q = Q_{\max} K C_e / (1 + K C_e), \quad (2)$$

式中:Q_{max} 为最大吸附量;K 为吸附平衡常数;C_e 为 Lyz 的平衡浓度;Q 为平衡吸附量。

1.6 吸附选择性的考察

方法同吸附等温线,选用卵清蛋白(OVA),人血清蛋白(HSA),辣根过氧化物酶(HRP)作为参比蛋白,并计算印迹因子 I_F.

$$I_F = Q_{MIP}/Q_{NIP}. \quad (3)$$

1.7 实际样品分析

取鸡蛋清样品稀释 20 倍后,8 000 r·min⁻¹离心 10 min,取上清液作为实际样品进行后续实验. 采用 SDS-PAGE 凝胶电泳对未经处理的鸡蛋清样品和经过 Fe₃O₄MNP-ZnSQD@MIPs 处理的鸡蛋清样品进行分析. 其中 3 条泳道分别为 Marker、未经处理的鸡蛋清样品、经过 Fe₃O₄MNP-ZnSQD@MIPs 处理的鸡蛋清样品。

2 结果与讨论

2.1 磁性荧光复合微球的制备

本文制备的 Fe₃O₄MNP-ZnSQD, 主要包含磁性纳米颗粒表面羧基修饰、EDC/NHS 活化和氨基修饰量子点连接 3 个部分. 磁性纳米颗粒表面经由羧基修饰,可以改善其在水相中的溶解度、分散性和生物相容性,并且保护磁颗粒结构不被破坏,增强耐酸耐碱抗氧化能力. 加入 EDC 试剂后,磁颗粒的表面羧基与 EDC 上的 C=N 键结合,形成活泼的 O-酰基异硫脲中间体;因为中间体在水溶液中不稳定,容易水解,所以需要在 NHS 的作用下转变为 NHS-活性酯,生成具有稳定化学反应活性的酯键,进行后续的酰胺化反应. 最后,将 EDC/NHS 试剂活化后的磁性纳米颗粒的表面羧基与硫化锌量子点的表面氨基结合生成酰胺键,得到 Fe₃O₄MNP-ZnSQDs.

通过对合成的 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{MNP-ZnSQDs}$ 进行荧光测定,可观测到明显的荧光发射. 在外加磁场磁分离 5 min 后,观测到上清液荧光强度显著降低.

2.2 磁性荧光分子印迹微球的合成

本实验以 Lyz 为模板蛋白, MBA 为交联剂, AAm、NIPAAm、MAA 为功能单体形成网络骨架,如图 1 所示,再通过分子间作用力、氢键、金属螯合等作用力将 Lyz 分子印迹微球包覆在 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{MNP-}$

ZnSQDs 表面. 通过洗脱剂洗脱模板蛋白,在 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{MNP-ZnSQDs}$ 表面形成与模板蛋白在结构、大小、官能团互补的印迹空穴,从而实现 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{MNP-ZnSQD@MIPs}$ 对 Lyz 的选择性结合. 采用表面印迹技术制备的磁性荧光分子印迹微球具有的粒径小、比表面积高等特点,有利于模板蛋白的传质吸收. 制备的印迹微球对 Lyz 具有特异结合能力,因此能在外加磁场的作用下快速富集、分离 Lyz.

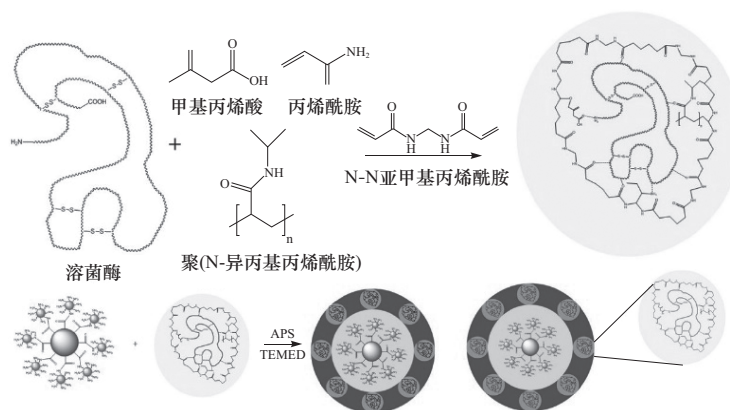


图 1 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{MNP-ZnSQD@MIPs}$ 聚合反应过程

Fig. 1 Synthesis reaction of $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{MNP-ZnSQD@MIPs}$

2.3 表征

实验采用高分辨率透射电镜对制备的 MNP-QDs、MNP-QD@MIPs 进行粒径和形貌特征分析. 由图 2(a)可知,合成的 MNP-QDs 接近球形,分散

均一,粒径约为 50 nm;由图 2(b)可以看出,制备的 MNP-QD@MIPs 可以看见明显的“核-壳”结构,粒径与 MNP-QDs 相比明显增大,印迹微球层在 10 nm 左右,边缘较薄,有利于模板分子的结合与洗脱.

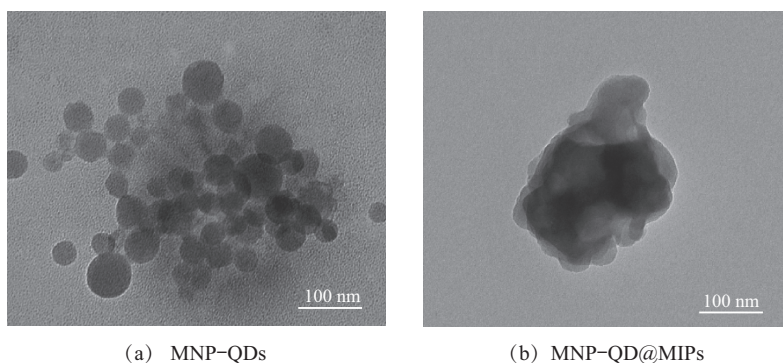


图 2 透射电镜图

Fig. 2 TEM images

实验采用 X 射线粉末衍射仪对合成的磁性荧光复合微球进行了结构分析. 由图 3(b)可以明显看出,合成的 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{MNP-ZnSQDs}$ 在 30.12° , 35.44° , 57.00° , 62.56° 和 28.6° , 47.6° , 56.3° 具有明显的衍射峰,分别与硫化锌量子点 (ZnS 标准立方卡, PDF # 12 - 0688) 和四氧化三铁磁性纳米颗粒 ($\text{Fe} +$

$2\text{Fe} + 3\text{O}_4$ 标准立方卡, PDF # 19 - 0629) 的晶面衍射对应,说明实验利用酰胺反应成功将 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{MNP}$ 和 ZnSQD@MIPs 化学结合制备了磁性荧光纳米复合材料.

采用振动样品磁强仪对制备的材料进行磁强度测量,测量条件为常温 25°C , 场强 $\pm 10\,000\text{ G}$,

结果如图3(c)所示. 合成的 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{MNP-ZnSQRD@MIPs}$ 与 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{MNP-ZnSQRDs}$ 的磁滞回线均表现出典型的超顺磁性, 饱和磁强度分别为 $40 \text{ emu} \cdot \text{g}^{-1}$

和 $45 \text{ emu} \cdot \text{g}^{-1}$. 与 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{MNP-ZnSQRDs}$ 相比, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{MNP-ZnSQRD@MIPs}$ 的饱和磁强度略微降低, 这主要是由于其表面包覆了蛋白分子印迹微球壳层.

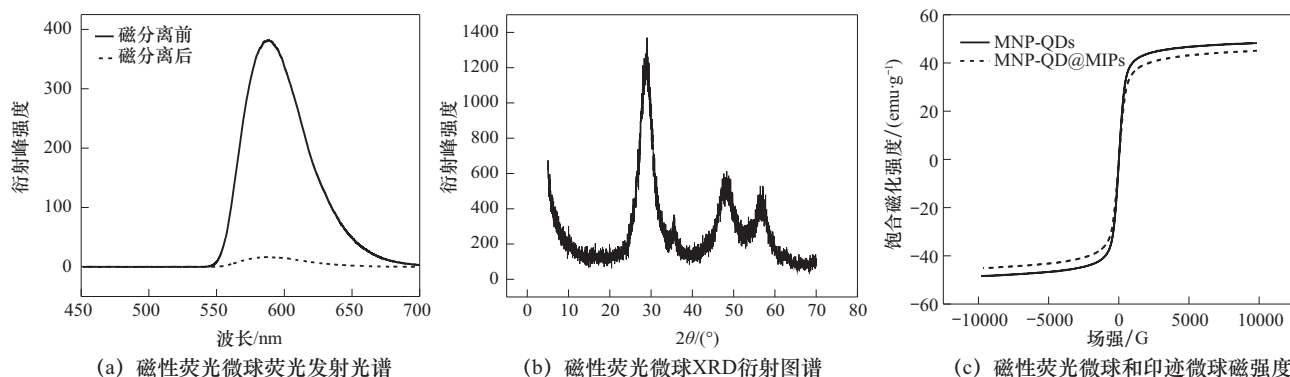


图3 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{MNP-ZnSQRDs}$ 、 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{MNP-ZnSQRD@MIPs}$ 的性能表征

Fig. 3 Performance characterization of $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{MNP-ZnSQRDs}$ and $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{MNP-ZnSQRD@MIPs}$

2.4 吸附动力学测定

实验考察了 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{MNP-ZnSQRD@MIPs}$ 与 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{MNP-ZnSQRD@NIPs}$ 对模板蛋白 Lyz 的吸附动力学. 结果如图4(a)所示, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{MNP-ZnSQRD@MIPs}$ 在加入 Lyz 的前 5 min 吸附量急剧增加, 随后吸附量变化趋于稳定, 在 15 min 达到吸附平衡. 而非印迹微球的吸附平衡时间在 35 min 出现, 与印迹

微球相比, 对 Lyz 的吸附量也很低. 这主要是由于 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{MNP-ZnSQRD@MIPs}$ 上存在大量的与 Lyz 形状、大小相匹配的结合位点, 有利于溶菌酶蛋白分子的结合, 而 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{MNP-ZnSQRD@NIPs}$ 上不存在特异性空穴. 因此, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{MNP-ZnSQRD@MIPs}$ 与 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{MNP-ZnSQRD@NIPs}$ 相比拥有更大的吸附量和更快的吸附速率.

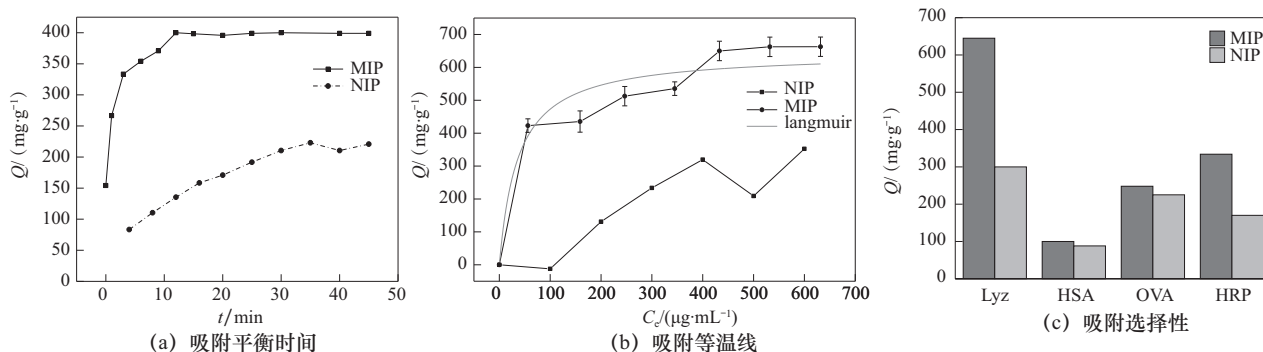


图4 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{MNP-ZnSQRD@MIPs}$ 与 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{MNP-ZnSQRD@NIPs}$ 的吸附性能

Fig. 4 The adsorption property of $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{MNP-ZnSQRD@MIPs}$ and $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{MNP-ZnSQRD@NIPs}$

2.5 吸附等温实验

实验进一步考察了 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{MNP-ZnSQRD@MIPs}$ 和 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{MNP-ZnSQRD@NIPs}$ 对 Lyz 的吸附性能. 一般来说, 对吸附能力进行评价时, 通常采用 Langmuir 和 Freundlich 吸附模型. 结果表明印迹微球更符合 Langmuir 模型, 说明制备的印迹微球对 Lyz 是均一体系的单层吸附. 由图4(b)可知, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{MNP-ZnSQRD@MIPs}$ 最大吸附量为 $645.76 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{MNP-ZnSQRD@NIPs}$ 最大吸附量为 $300 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{MNP-ZnSQRD@MIPs}$

具有较高的吸附量. 这是因为量子点与 MNPs 结合后, 在其表面形成了规则的骨架结构, 骨架内部产生了新的作用位点, 提高了材料的比表面积. 此外印迹聚合层仅有 10 nm, 利于蛋白质分子的结合, 有效的提升了 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{MNP-ZnSQRD@MIPs}$ 的吸附量.

2.6 吸附选择性的考察

实验选用卵清蛋白、人血清蛋白、辣根过氧化物酶作为参比蛋白考察了 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{MNP-ZnSQRD@MIPs}$ 和 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{MNP-ZnSQRD@NIPs}$ 的吸附选择性. 如图4(c)所示, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{MNP-ZnSQRD@MIPs}$ 对 Lyz 的

最大吸附量为 $645.76\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$, 大于其它蛋白, 印迹因子为 2.15. $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{MNP-ZnSQD@MIPs}$ 在印迹过程中形成了与模板蛋白三维结构相匹配的印迹空穴, 因此对模板蛋白具有较高的吸附选择性. 而 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{MNP-ZnSQD@NIPs}$ 对不同蛋白的最大吸附量相差较小, 这是因为 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{MNP-ZnSQD@NIPs}$ 的合成过程中缺少模板蛋白, 不具有特异性的印迹空穴, 其吸附作用主要依赖于静电作用力、分子间作用力、氢键等, 不存在吸附特异性. 与已有文献报道的印迹方法相比(表 1), 制备的 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{MNP-ZnSQD@MIPs}$ 的最大吸附量更高、吸附速率更快.

表 1 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{MNP-ZnSQD@MIPs}$ 及 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{MNP-ZnSQD@NIPs}$ 与其他工作对比

Tab. 1 Comparison of $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{MNP-ZnSQD@MIPs}$ and $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{MNP-ZnSQD@NIPs}$ with other jobs

印迹体系	$Q_{\text{MIP}}/(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$	$Q_{\text{NIP}}/(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$	平衡时间/min	I_F	参考文献
$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{MNP-ZnSQDs@MIPs}$	645.76	300.00	15	2.15	本工作
MNP-OEG@MIPs	204.00	116.20	120	2.15	[7]
MNP-COOH@MIPs	91.74	10.35	30	8.86	[15]
MNP@VTEO@IL@MIPs	213.7	105.79	150	2.02	[19]
DES-MNP@SiO ₂ -MIP	108.00	51.92	1 440	2.08	[20]
SiO ₂ -RAFT@MIPs	5.60	1.51	60	3.70	[21]
MNP@MIPs	202.02	99.03	45	2.04	[22]
SiO ₂ -C ₂ H ₃ @MIPs	17.70	12.12	5	1.46	[23]
SiO ₂ -COOH@MIPs	39.50	18.63	60	2.12	[24]
MNP-dopamine@MIPs	240.00	65.40	720	3.67	[25]
MNP@MIPs	110.00	13.10	100	8.40	[26]
MNP-MPS@MIPs	104.80	13.79	300	7.60	[27]

2.7 实际样品分析

实验研究了 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{MNP-ZnSQD@MIPs}$ 在鸡蛋清样品中的实际应用能力, 分别测定了未处理鸡蛋清样品和经过 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{MNP-ZnSQD@MIPs}$ 处理后的鸡蛋清样品的 SDS-PAGE 凝胶电泳, 结果如图 5 所示. 泳道 1 为未处理的鸡蛋清样品, 在 15 kDa 下方可观察到清晰的 Lyz(14.4 kDa) 条带; 泳道 2 为经过 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{MNP-ZnSQD@MIPs}$ 处理后的鸡蛋清样品, 可观察到其 Lyz 条带灰度下降, 宽度变窄, 而其他蛋白质的丰度基本不变. 由此可得, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{MNP-ZnSQD@MIPs}$ 能够在复杂样品中实现对 Lyz 的选择性吸附分离.

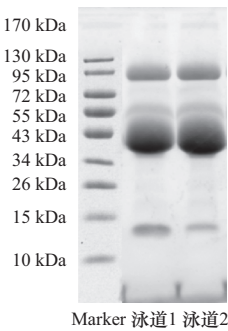


图 5 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{MNP-ZnSQD@MIPs}$ 处理前后鸡蛋清样品 SDS-PAGE
Fig. 5 SDS-PAGE analysis of Lyz before and after $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{MNP-ZnSQD@MIPs}$ process

3 结 论

本文以 Lyz 为模板蛋白, AAm、NIPAAm、MAA 为功能单体, MBA 为交联剂, TEMED、APS 为引发剂, 利用分子印迹技术制备了磁性荧光蛋白分子印迹微球. 结果表明, 制备的 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{MNP-ZnSQD@MIPs}$ 吸附平衡时间为 15 min, 最大吸附量为 $645.76\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$, 印迹因子为 2.15. 实验采用表面印迹技术, 有效降低分子印迹微球的团聚程度, 提高其在溶液中的分散性, 并增大比表面积, 提升吸附能力. 该印迹微球吸附平衡时间短, 对 Lyz 具有很高的吸附容量, 吸附特异性良好, 为复杂生物样品中目标蛋白质的快速分离分析提供了新的思路.

参考文献:

[1] Manova E, Kunev B, Paneva D, et al. Mechano-synthesis, characterization, and magnetic properties of nanoparticles of cobalt ferrite, CoFe_2O_4 [J]. Chemistry of Materials, 2004, 26(16): 5689 - 5696.
[2] Ashley J, Wu K, Hansen M F, et al. Quantitative detection of trace level cloxacillin in food samples using magnetic molecularly imprinted polymer extraction and surface-enhanced raman spectroscopy nanopillars [J]. Analytical Chemistry, 2017, 21(89): 11484 - 11490.
[3] Zou W S, Jing Y, Yang T T, et al. Magnetic-room temperature phosphorescent multifunctional nanocomposites as chemosensor for degradation of 2, 4, 6 - trinitrotoluene [J]. Journal of Materials Chemistry, 2012, 22: 4720 - 4727.
[4] Nan L, Li Q, Ying S, et al. Novel oligo(ethylene glycol)-based molecularly imprinted magnetic nanoparticles for thermally modulated capture and release of lysozyme [J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2014, 19(6): 17289 - 17295.
[5] Li X M, Wu Y, Zhang S, et al. CsPbX_3 quantum dots for lighting and displays: room-temperature synthesis, pho-

- toluminescence superiorities, underlying origins and white light-emitting diodes[J]. *Advanced Functional Materials*, 2016, 15(26): 2584 – 2594.
- [6] Xu Y, Wang Z, Guo Z, et al. Solvothermal synthesis and ultrafast photonics of black phosphorus quantum dots [J]. *Advanced Optical Materials*, 2016, 4: 1223 – 1229.
- [7] Selvan S T, Patra P K, Ang C Y, et al. Synthesis of silica-coated semiconductor and magnetic quantum dots and their use in, the imaging of live cells[J]. *Angewandte Chemie*, 2007, 46(14): 2448 – 2452.
- [8] Liu C H, Tsao M H, Sahoo S L, et al. Magnetic nanoparticles with fluorescence and affinity for DNA sensing and nucleus staining[J]. *Rsc Advances*, 2017, 10(7): 5937 – 5947.
- [9] Jiang J, Gu H, Shao H, et al. Bifunctional Fe_3O_4 -Ag heterodimer nanoparticles for two-photon fluorescence imaging and magnetic manipulation[J]. *Advanced Materials*, 2008, 23(20): 4403 – 4407.
- [10] Xiao D, Dramou P, Xiong N, et al. Preparation of molecularly imprinted polymers on the surface of magnetic carbon nanotubes with a pseudo template for rapid simultaneous extraction of four fluoroquinolones in egg samples[J]. *Analyst*, 2013, 11(138): 3287 – 3296.
- [11] Levinson S S, Elin R J, Yam L. Light chain proteinuria and lysozymuria in a patient with acute monocytic leukemia[J]. *Clinical Chemistry*, 2002, 7(48): 1131 – 1132.
- [12] Lim G W, Lim J K, Ahmad A L, et al. Fluorescent molecularly imprinted polymer based on navicula sp. frustules for optical detection of lysozyme[J]. *Analytical & Bioanalytical Chemistry*, 2016, 8(408): 2083 – 2093.
- [13] 耿利娜, 全宗良, 侯妮, 等. 蛋白质分离玻璃微流控芯片的制作方法[J]. *北京理工大学学报*, 2013, 33(4): 436 – 440.
- Geng Lina, Quan Zhongliang, Hou Ni, et al. Improvement of microfluidic chip fabrication for protein separation[J]. *Transactions of Beijing Institute of Technology*, 2013, 33(4): 436 – 440. (in Chinese)
- [14] 戴荣继, 梁艳丽, 刘宗建, 等. 基于 N-异丙基丙烯酰胺的温度敏感色谱材料[J]. *北京理工大学学报*, 2015, 35(11): 1205 – 1210.
- Dai Rongji, Liang Yanli, Liu Zhongjian, et al. Thermoresponsive chromatography materials based on n-isopropylamide[J]. *Transactions of Beijing Institute of Technology*, 2015, 35(11): 1205 – 1210. (in Chinese)
- [15] Yang S, Zhang X, Luo A Q, et al. Preparation and evaluation of Fe_3O_4 nanoparticles incorporated molecularly imprinted polymers for protein separation[J]. *Journal of Materials Science*, 2015, 2(51): 937 – 949.
- [16] Zhang X, Yang S, Luo A Q, et al. Surface-imprinted polymer coating L-cysteine-capped ZnS quantum dots for target protein specific recognition[J]. *Journal of Materials Science*, 2016, 12(51): 6075 – 6085.
- [17] Wang H F, He Y, Ji T R, et al. Surface molecular imprinting on Mn-doped ZnS quantum dots for room-temperature phosphorescence optosensing of pentachlorophenol in water [J]. *Analytical Chemistry*, 2009, 4(81): 1615 – 1621.
- [18] Koneswaran M, Narayanaswamy R. Mercaptoacetic acid capped CdS quantum dots as fluorescence single shot probe for mercury (II) [J]. *Sensors & Actuators B Chemical*, 2009, 1(139): 91 – 96.
- [19] Xu W, Dai Q Z, Wang Y Z, et al. Creating magnetic ionic liquid-molecularly imprinted polymers for selective extraction of lysozyme[J]. *RSC Advances*, 2018, 8(39): 21850 – 21856.
- [20] Xu K, Wang Y, Wei X, et al. Preparation of magnetic molecularly imprinted polymers based on a deep eutectic solvent as the functional monomer for specific recognition of lysozyme [J]. *Microchimica Acta*, 2018, 2(185): 146 – 153.
- [21] Li Q, Yang K, Liang Y, et al. Surface protein imprinted core-shell particles for high selective lysozyme recognition prepared by reversible addition fragmentation chain transfer strategy[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2014, 6(24): 21954 – 21960.
- [22] Wan W, Han Q, Zhang X, et al. Selective enrichment of proteins for MALDI-TOF MS analysis based on molecular imprinting [J]. *Chemical Communications*, 2015, 17(51): 3541 – 3544.
- [23] He H, Fu G, Wang Y, et al. Imprinting of protein over silica nanoparticles via surface graft copolymerization using low monomer concentration[J]. *Biosens Bioelectron*, 2010, 26: 760 – 765.
- [24] Fu G, He H, Chai Z, et al. Enhanced lysozyme imprinting over nanoparticles functionalized with carboxyl groups for noncovalent template sorption[J]. *Analytical Chemistry*, 2011, 4(83): 1431 – 1436.
- [25] Zhang M, Zhang X, He X, et al. A selfassembled polydopamine film on the surface of magnetic nanoparticles for specific capture of protein [J]. *Nanoscale*, 2012, 4(10): 3141 – 3147.
- [26] Jing T, Du H, Dai Q, et al. Magnetic molecularly imprinted nanoparticles for recognition of lysozyme[J]. *Biosens Bioelectron*, 2010, 2(26): 301 – 306.
- [27] Cao J, Zhang X, He X, et al. The synthesis of magnetic lysozyme-imprinted polymers by means of distillationprecipitation polymerization for selective protein enrichment[J]. *Chemistry-An Asian Journal*, 2014, 2(9): 526 – 533.

(责任编辑:李兵)