

磁性蛋白印迹复合微球的研究进展

周静静¹, 王雨霏¹, 胡小玲¹, 张秋禹^{1,2*}

(1. 西北工业大学理学院, 西安 710129; 2. 西北工业大学深圳研究院, 深圳 518057)

摘要: 磁性蛋白印迹复合微球因其特异性识别、高效分离目标蛋白的优点在蛋白分离和检测中具有重要的应用价值。由于蛋白分子自身的结构性质, 磁性蛋白印迹材料在制备及进一步提升性能方面还面临着诸多的挑战。本文综述了磁性蛋白印迹复合微球的制备方法及其提高其印迹效率的设计策略方面的研究进展, 并介绍了磁性蛋白印迹复合微球在蛋白分离、免疫分析、生物传感等方面的应用研究新进展。

关键词: 蛋白印迹; 磁性复合微球; 分离效率; 特异识别性能

引言

蛋白印迹聚合物 (protein imprinted polymers, PIPs) 是一种仿生“抗原-抗体”作用, 通过交联剂使功能单体与模板蛋白共聚合, 在洗脱模板蛋白后形成的具有特异性吸附、识别蛋白性能的“人工聚合物受体”, 其在蛋白分离、免疫分析、生物传感等领域有重要的应用价值^[1]。将磁性粒子引入到蛋白印迹材料中, 可实现在外加磁场下的快速收集分离, 提高印迹材料的使用回收效率, 因此, 磁性蛋白印迹复合微球 (magnetic protein imprinted particles, MPIPs) 受到了越来越多的关注^[2]。

近年来, 为进一步提高 MPIPs 对模板蛋白的印迹及识别效率, 发展出了多种实用的设计策略, 并借助高分子合成方法的进步实现对设计材料的高效构筑。本文从印迹材料的结构设计入手, 对引入结构合理的刺激响应性聚合物、优化磁性载体微球的表面功能性以及通过接枝抗蛋白链段降低蛋白非特异性吸附等三方面策略的研究进展进行了综述, 着重阐述了材料结构的变化对提高 MPIPs 选择识别性的影响规律, 并结合 MPIPs 的应用对这类材料的发展进行了展望。

1 MPIPs 的有效制备方法

相比小分子印迹, 蛋白分子由于其自身的分子量大、构象灵活等特殊性质使得 MPIPs 的制备面临较大的挑战^[3, 4]。首先, 分子尺寸大使得蛋白分子不能像小分子那样容易地进出印迹空腔, 造成 MPIPs 上大量印迹位点的浪费; 其次, 由于大多数蛋白在有机溶剂、强酸、强碱或者高温的环境下会发生不可逆的结构变化, 所以对制备条件提出了很多要求。为了解决这些问题, 相应地发展了两种有效的新制备方法, 有力地推动了磁性蛋白印迹材料的发展。

1.1 表面蛋白印迹

传统印迹方法中, 由于聚合物对模板蛋白包埋过深, 致使蛋白很难被洗脱出来。针对于此, 表面印迹方法应运而生^[5~8]。表面蛋白印迹是将聚合物中的印迹位点尽可能地集中在表面, 从而使蛋白与印迹位点有良好的可接触性, 在蛋白吸附和洗脱过程中减小传质阻力, 提高印迹聚合物对蛋白的再结合效率^[9~15]。

Li 等^[16] 用 3-氨基苯基硼酸作为功能单体和交联单体, 在二氧化硅包覆的磁性微球表面制备了牛血

10.14028/j.cnki.1003-3726.2019.10.005

收稿: 2019-06-19; 修回: 2019-08-16;

基金项目: 国家重点自然科学基金 (51433008), 深圳市未来产业专项资金 (JCYJ20160331142330969);

作者简介: 周静静, 博士研究生, 研究方向为磁性蛋白印迹复合材料;

* 通讯联系人: 张秋禹, 博士, 教授, 主要从事功能高分子材料与微纳米尺度高分子/无机物复合材料的研究。E-mail: qyzhang@nwpu.edu.cn.

红蛋白(bovine hemoglobin, BHb)印迹聚合物。该类 MPIPs 可快速达到吸附平衡,在外加磁场的作用下能实现高效分离。Tang 等^[11]将 BHb 通过非共价相互作用固定在用氨基功能化的 Fe_3O_4 纳米颗粒上,以硅氧烷为功能单体进行聚合,在磁性微球表面共聚形成了围绕 BHb 的印迹聚合物网络。Zhu 等^[17]在硼酸盐功能化的磁性复合微球的表面将卵清蛋白固定,结合表面蛋白印迹技术与苯胺的氧化还原聚合,制备了对模板蛋白具有优异识别性(印迹因子, IF=7.51)的 MPIPs。

1.2 抗原决定基印迹

表面蛋白印迹法虽然解决了蛋白洗脱和再结合的难题,但蛋白结构易变导致的印迹腔不准确以及聚合方法受限的问题依然没有得到很好的改进。对此,研究者们开发出了抗原决定基法^[18~21]。这种技术是利用目标蛋白的蛋白序列中裸露的一个或几个特异肽链段(即抗原决定基)为模板分子,制备印迹材料用来识别吸附带有该链段的目标蛋白。该法的优势就是将大分子蛋白印迹简化成了小分子印迹,从而避免了蛋白结构易变带来的影响^[22]。

2001 年,Minoura 等^[23]以小分子四肽为模板,合成了能够识别具有模板四肽特征片段且分子体积较大的催产素的印迹聚合物,并提出了“抗原决定基法”。后来,Zhang 等^[5]用 His-tag-蛋白抗原决定基作为模板分子,通过多巴胺自聚合控制印迹壳层厚度,制备的 MPIPs 具有较高的模板利用率,且对抗原决定基和蛋白具有良好的特异识别能力。值得一提的是,His-tag 具有良好的亲水性,该法可用于具有不同极性的抗原决定基印迹中。Hu 等^[24]用一种新型环糊精离子液体作为功能单体,结合抗原决定基表面印迹技术,选择细胞色素 C(cytochrome C, Cyt C)表面暴露的残基作为模板分子,合成了抗原决定基 MPIPs (如图 1 所示)。这种 MPIPs 具有较高的吸附量(67.6 mg/g)和优良的识别性能(IF=4.54)。

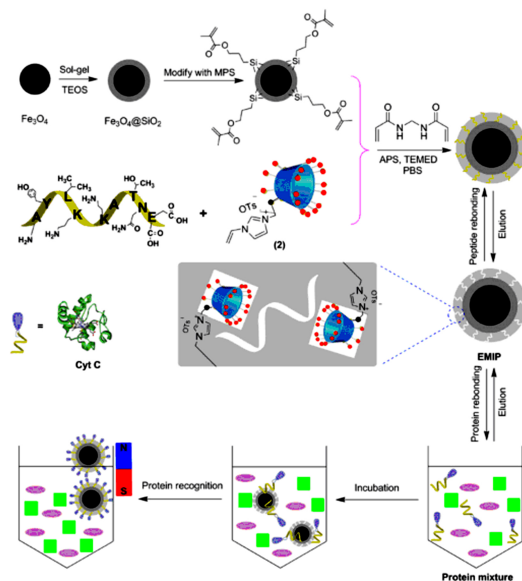


图 1 Cyt C 抗原决定基磁性印迹制备过程示意图^[24]

Figure 1 Schematic illustration of the preparation process of Cyt C epitope imprinted MPIPs^[24]

2 提高印迹材料分离效率的设计策略

随着蛋白印迹技术的发展,如何实现目标蛋白分子的高效分离和特异性识别成为研究者们越来越关注的问题。目前,应用于提升 MPIPs 印迹识别性能的方法主要有通过设计结构合理的刺激响应性聚合物、优化载体微球与目标蛋白的亲合性以及降低蛋白非特异性吸附等 3 种。

2.1 刺激响应性聚合物结构设计

刺激响应性聚合物,也称为环境响应聚合物或智能聚合物,能够响应特定的外部刺激,进而发生明显

的结构或性质变化,例如,分子链结构、溶解度、溶胀或解离行为等变化。将刺激响应性聚合物引入 MIPs,可实现蛋白在特定环境中的吸附或释放。目前不仅已经把单一刺激响应性聚合物引入 MIPs,而且还将具有温度响应、pH 响应、光响应等多种刺激响应性的聚合物复合并应用于 MIPs 中,以实现材料对蛋白的高效分离回收。

温度响应性聚合物会随温度改变其自身结构及体积。温度响应性聚合物一般都具有亲水基团和疏水基团,当温度低于最低共溶温度(lower critical solution temperature, LCST)时,亲水基团与水分子形成氢键,聚合物体积膨胀,甚至溶于水;而当温度高于 LCST 时,亲水基团与水之间的氢键被破坏,且聚合物的疏水作用增强,使得聚合物链聚集,凝胶网络收缩^[25, 26]。现在最常用的温度响应性聚合物是 LCST 约为 32℃ 的聚(*N*-异丙基丙烯酰胺)(PNIPAM)^[27, 28]。例如, Zhang 等^[29]以 $\text{Fe}_3\text{O}_4@4\text{-VP}$ (4-乙烯基吡啶)微球为载体,制备了基于 PNIPAM 的温度响应性印迹聚合物,这类印迹微球不仅对外部环境温度响应灵敏,对模板蛋白牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)也展现出良好的快速捕获和识别能力。有趣的是, Ji 等^[30]选择氨基酸基单体——*N*-甲基丙烯酰基-*L*-丙氨酸甲酯作为温度响应性功能单体,合成了用于识别和分离溶菌酶(lysozyme, Lyz)的温度响应性 MIPs。研究表明,通过改变水溶液的温度,可以容易地实现 Lyz 的快速捕获,在 25℃ 下 15min 内即可吸附至饱和吸附量的 80% 以上。此外,基于温度响应性单体甲基丙烯酸 2-(2-甲氧基乙氧基)乙基酯, Li 等^[31]合成了以 Lyz 为模板蛋白的 MIPs,通过改变外界温度即可实现 Lyz 的捕获、释放过程,避免了繁琐的模板洗脱步骤。上述两类新的 MIPs 对实际样品中的模板蛋白都具有优异的分离回收性能,这对新型温度响应性印迹体系的开发提供了新思路。

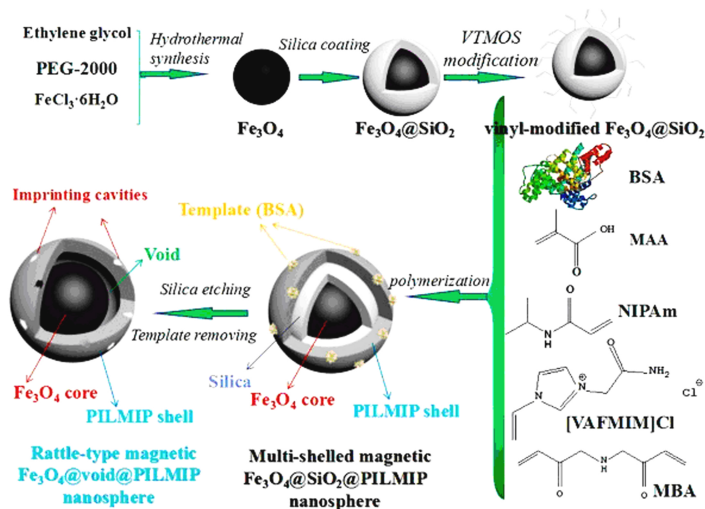
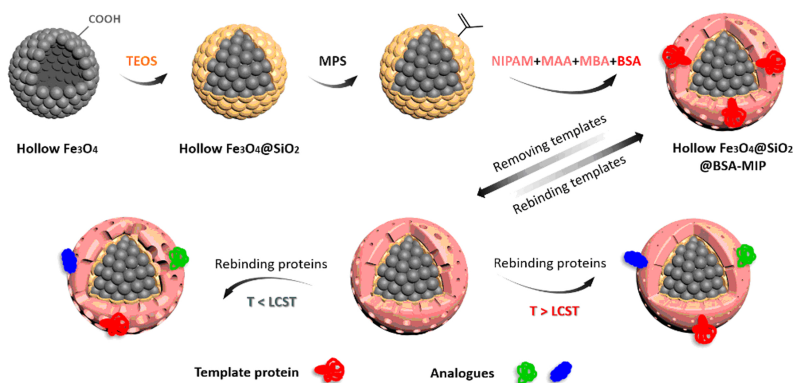
pH 响应性聚合物一般含有对 pH 变化敏感的羧基或氨基等可电离的官能团,可以在特定的 pH 下提供或接受质子,进而引起聚合物链的流体动力学体积的变化,换言之,即可产生体积相变^[1, 32]。Xie 等^[33]选用甲基丙烯酸 2-(二甲氨基)乙酯作为 pH 响应单体,4-乙烯基苯基溴酸作为硼酸酯亲和单体,采用自由基聚合法,在磁性微球表面合成了卵清蛋白(Ovalbumin, OVA)的印迹聚合物薄层。在该体系中,通过改变溶液 pH 可以实现 OVA 的快速捕获释放,10min 内吸附量就能达到 81.2mg/g。除此之外, Fan 等^[34]选用 α -甲基丙烯酸(α -methacrylic acid, MAA)和 NIPAM 分别作 pH 和温度响应性单体,BSA 为模板蛋白,采用硬模板法合成了具有双重响应性的摇铃状磁性空心分子印迹聚离子液体(ionic liquids, ILs)纳米球,如图 2 所示。双重响应性因素的引入,对提高印迹材料对蛋白的识别和洗脱效率具有重要作用,10min 即可实现蛋白的吸附平衡。

光响应性聚合物可随外部刺激——光的变化而快速通过物理或化学变化来予以响应。通常,光刺激或光照射会导致基团异构化或解离的发生^[35]。Xie 等^[36]选用 4-[(4-甲基丙烯酰氧基)苯基偶氮]苯磺酸为光响应性单体,以 Fe_3O_4 微球做载体制备了 BHb 的响应性印迹材料。在波长为 365nm 和 440nm 的交替光照下,制备的 MIPs 对 BHb 具有很好的控释效应:在 365nm 处释放 31.4% BHb,而在 440nm 处可将 67.2% 的 BHb 结合到 MIPs 上,这在生物样品中富集痕量蛋白方面表现出显著的优势。Chen 等^[37]在 Fe_3O_4 微球上包覆了纤维状 SiO_2 ,以此为基球在表面合成了近红外(NIR)光响应性 Lyz 印迹聚多巴胺层^[38, 39]。通过 NIR 激光(808nm, 3.3W/cm²)触发 Lyz 控释,能够 30min 内实现 700mg/g 的高效吸附,而且释放的 Lyz 仍然保持良好的生物活性,可有效分解大肠杆菌。

作者课题组开展了一系列温度响应性 MIPs 的研究^[40~43],如图 3 所示。这些工作不仅证明了温度响应性聚合物 PNIPAM 在该体系中对模板蛋白吸附识别的重要作用,还通过对比实验,考察了印迹聚合物的交联度和壳层厚度之间的平衡关系,确定以 17nm 的壳层厚度及 20% 的交联度为平衡值。以此为前提,制备的 MIPs 不仅具有良好的温度响应性和选择识别性,经历一次洗涤过程后模板蛋白的洗脱效率高达 78.60%。

2.2 载体与模板蛋白亲和性的优化设计

蛋白印迹材料的结构优化一般是基于模板蛋白与载体材料及功能单体之间的共价或非共价相互作用

图 2 摇铃状蛋白印迹磁性复合微球的制备流程图^[34]Figure 2 Schematic illustration of the preparation of the rattle-type MPIPs^[34]图 3 温度响应性蛋白印迹磁性复合微球的制备流程及识别机理^[41]Figure 3 Scheme of synthesis and thermo-sensitive recognition performances of MPIPs^[41]

用开展工作的。对于 MPIPs,在磁性载体表面如何修饰、优化功能化物质,实现蛋白的有效结合,是提升印迹材料识别性能和分离能力的关键。

通过设计载体的功能化表面,利用有效的非共价作用来固定蛋白分子,进而实现印迹聚合物的合成,可实现高效的特异性吸附识别目标蛋白^[44~46]。Gao 等^[11]利用非共价相互作用将 BHb 固定在表面修饰了氨基的 Fe_3O_4 微球上,再通过硅氧烷共聚合把模板蛋白固定在了印迹空腔中。Guo 等^[47]把壳聚糖包覆在磁性颗粒的表面,修饰马来酸酐后,利用其羧基捕获模板蛋白 Lyz,进行印迹聚合后得到的印迹微球对 Lyz 有着良好的特异结合性。Hao 等^[48]通过酰胺化反应将氨基苯硼酸接枝在了醛官能化的磁性颗粒上,再利用非共价亲和结合,借助硼酸盐固定糖蛋白,经由多巴胺自聚合将印迹聚合物包覆在磁性颗粒的表面。Shoghi 等^[49]在功能化的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2$ 微球表面通过点击反应接枝了 1,4-二硫苏糖醇,利用其巯基与模板蛋白 BSA 之间较强的非共价作用来捕获 BSA,采用表面印迹技术实现了有效吸附 BSA 的印迹材料的合成。选取易于修饰或接枝的合适有机配体,将一定程度上改善印迹体系,实现模板蛋白的有效印迹,这种可行性高、性能良好的方法极具开发和应用前景。

离子液体(ILs)被认为是生物体系中的优良溶剂,它具备很多突出的优点,如蒸汽压可忽略不计、热稳定性好、液体区域宽、可燃性低、溶解能力强、离子电导率高、可设计性好等^[24, 50]。因此,基于 ILs 的材料被广泛应用于生物活性物质的分析和分离。通常通过多种相互作用机制,如氢键、疏水、 $\pi-\pi$ 堆积、静

电和离子交换作用等,来促进分离^[21, 51~53]。Qian 等^[54]在 Fe_3O_4 微球上依次实现了功能基团氯的修饰、1-甲基咪唑类 ILs 的包覆,然后将 BSA 通过氢键、 π - π 堆积等相互作用固定在微球表面,借助 Zeta 电位定性表征,结果证明其蛋白固定化能力比 Fe_3O_4 裸颗粒高约 9 倍;最后选择可自聚合的多巴胺作功能单体实现了 BSA 的印迹聚合。他们还探究了印迹层厚度对印迹纳米粒子识别能力的影响,结果表明,20nm 是获得最佳识别能力的厚度,印迹因子达到了 3.33。Dai 等^[55]把水相容的咪唑类离子液体,氯化 N -3-(3-三乙氧基甲硅烷基丙基)-3-氨基丙基咪唑鎓,修饰在 $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{SiO}_2$ 微球表面,进而固定 DNA,利用溶胶凝胶法制备了印迹聚合物。该法获得的印迹空腔具有良好的生物相容性,在 pH 为 5.10 时表现出优异的 DNA 特异性吸附能力(162mg/g)和对非印迹分子的再结合选择性(IF 高达 6.6)。

金属离子可通过自身的 d 轨道与蛋白分子中 N、O 上的孤对电子形成配位键,使得利用金属配位作用来富集分离蛋白的方法简单可行^[56, 57],且在蛋白印迹领域也已经有一定的实际运用^[58~60]。结合磁性材料,Kartal 等^[61]使用亚氨基二乙酸作为 Cu^{2+} 配位剂,通过配位作用将人血清白蛋白(human serum albumin, HSA)固定在磁性复合微球的表面上,以正硅酸乙酯和 3-氨基丙基三甲氧基硅烷为功能单体,实现了用于选择性识别 HSA 的复合印迹微球的制备。Shi 等^[62]以正硅酸乙酯为有机硅源,利用溶胶-凝胶法在磁性微球表面包覆了 SiO_2 ,并通过 SiO_2 表面水解生成的羟基螯合 Cu^{2+} 进而与 BHb 配位,合成了具有良好选择识别性能的 MIPs,如图 4 所示。这种利用金属配位作用的印迹技术对印迹材料的发展和蛋白组学的应用具有重要指导意义。

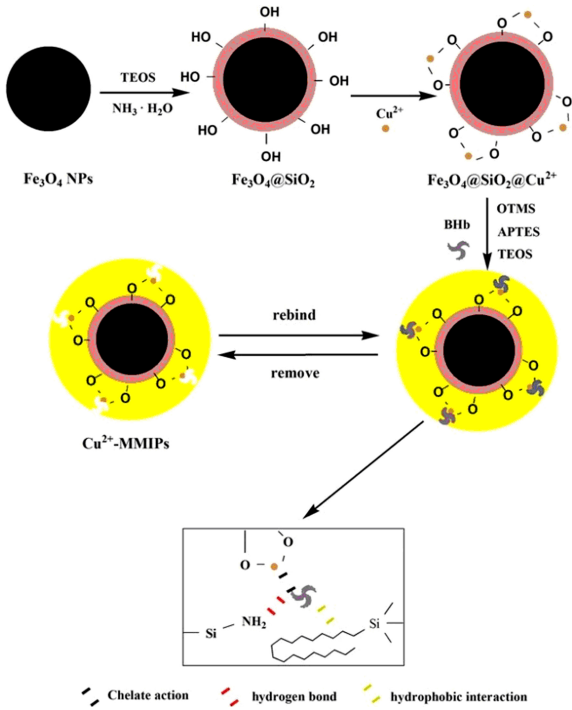


图 4 Cu^{2+} -MIPs 的合成过程^[62]

Figure 4 The synthetic process of Cu^{2+} -MIPs^[62]

作者课题组通过在磁性微球表面修饰羧基来提升对目标蛋白的吸附识别性能^[63]。以 $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{HEA}$ (丙烯酸羟乙基酯)为基球,用马来酸酐进行改性,丙烯酸酐和 N,N' -亚甲基双丙烯酰胺分别为功能单体和交联剂,利用自由基聚合法制备了 MIPs。研究表明,这类磁性印迹微球的吸附速率、吸附量和识别能力随着羧基密度的增加而增加。同时,羧基密度的增加有利于高等电点(等电点 >7)蛋白的识别效率的提高。此外, $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{HEA}$ 微球表面的羧基对印迹性能的影响受印迹层厚度的限制,通过实验确定了与模板蛋白 BSA 和 Lyz 大小相关的临界厚度范围分别为 25~40nm 和 10~25nm。

2.3 降低蛋白的非特异性吸附

印迹因子是研究材料特异性吸附性能的重要参数,很多已报道的方法很好地提高了蛋白印迹材料的吸附量,但对印迹因子的提升并不理想。由于印迹材料对蛋白的吸附,同时存在特异性吸附和非特异性吸附两种行为,所以,为提高蛋白印迹材料的特异性识别性能,作者课题组将目标放在了降低对蛋白的非特异性吸附上。

2-甲基丙烯酰氧乙基磷酸胆碱(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine, MPC)来源于细胞膜表面组分,用其制备的生物材料可有效抑制抗体的变性和材料表面蛋白的吸附。我们利用共沉淀法,以蛋白 BSA 为模板,引入抗蛋白吸附链段 MPC,设计制备了一种新型的 MPIPs,如图 5 所示。结果表明,加入 MPC 聚合后,磁性印迹微球对目标蛋白的吸附量下降较多,但 IF 恰可以高达 8.32。其原因在于,蛋白和功能单体的存在,会使抗蛋白单体在远离蛋白的位置参与聚合形成抗蛋白链段,当模板蛋白被洗脱后,留下的印迹位点可以正常吸附并识别蛋白;而不处于印迹位点的聚合物,则因为抗蛋白链段的存在降低了对蛋白的非特异性吸附,进而增强了材料总体的特异性识别性能^[64]。

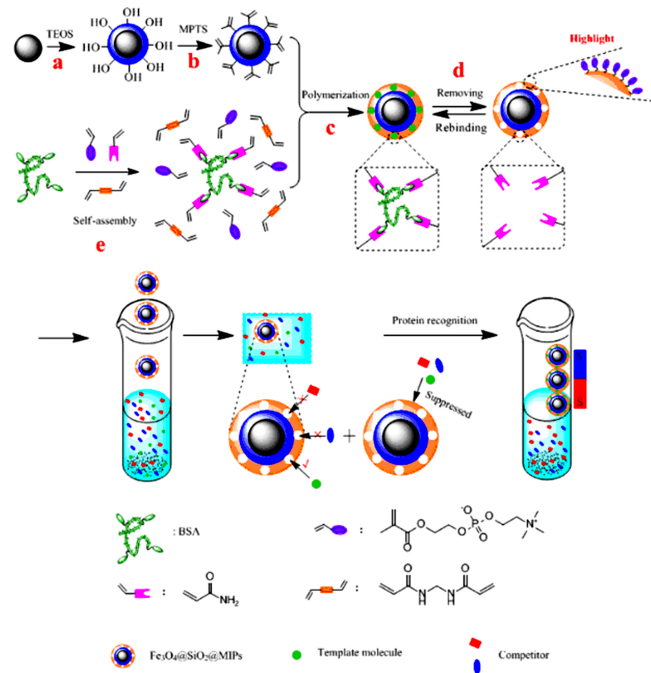


图 5 BSA 印迹磁性抗蛋白微球制备过程示意图^[64]

Figure 5 Schematic illustration of preparation process of BSA-MPIPs for anti-proteins^[64]

我们还合成了以 BSA 为模板分子,多巴胺为功能单体的 MPIPs,采用 AGET-ATRP 技术在印迹壳层的表面接枝了 MPC 聚合物链段,实现了 MPC 聚合物链段的排布和长度的精确可控,更有利于调控印迹层表面抗蛋白吸附能力的强弱,制备过程如图 6 所示。这里引入的 MPC 聚合物链段同样能够减少印迹壳层对蛋白的非特异性吸附,BSA 的吸附量较上一工作有所提高,印迹因子达到 5.74,表现出了优异的蛋白选择识别性能^[65]。

由于 MPC 成本较高且抗蛋白能力过强,易对蛋白的特异性吸附产生较大影响,所以,我们还在聚合过程中选择了甲基丙烯酰乙基磺基甜菜碱,以减弱分子印迹聚合物的蛋白非特异性吸附能力。选用磁性微球为载体,通过沉淀共聚法以 HEA 为功能单体,水溶性壳聚糖为功能单体和交联剂制备了 BSA-MPIPs。这种印迹微球对 BSA 也有很好的选择性吸附,IF 可达到 5.0^[66]。

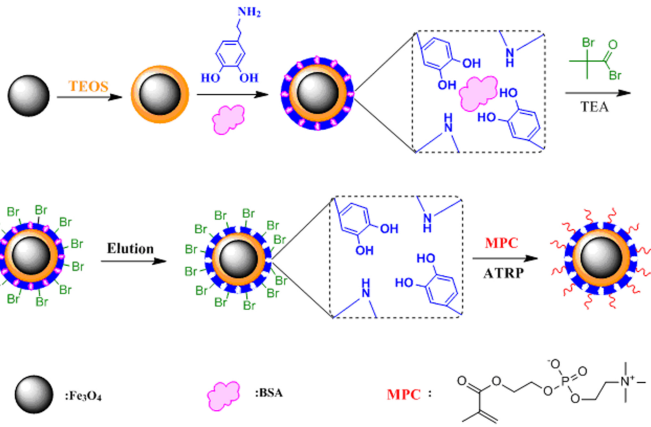


图 6 表面修饰 MPC 聚合物链段的 MPIPs 合成示意图^[65]

Figure 6 Schematic illustration of preparation of MPIPs modified with pMPC chains^[65]

3 应用

目前,磁性蛋白印迹材料因其分离效率高、制备及使用成本低,在生物传感、蛋白分离、免疫分析等领域有重要的应用。

众所周知,不同蛋白的等电点不同,且在 pH 不同的溶液中能表现出不同的带电性^[47],因此可应用于电化学传感技术中。Sun 等^[67]选用 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ 为基球,制备了具有规则结构和良好单分散性的血红蛋白印迹微球,并将其修饰在磁性玻碳电极上,开发了用于测定血红蛋白的快速且选择性良好的电化学传感器。值得注意的是,磁场的引入,使得对血红蛋白的电化学响应信号增加了 2 倍,在磁性印迹微球上吸附血红蛋白所需要的时间缩短至 7min 以内。此外,从结构设计的角度,可实现印迹荧光传感器的制备。Lü 等^[68]选择多巴胺作为功能单体,在磁性碳量子点表面合成了 BHb 印迹聚合物壳层,用于灵敏地选择性荧光识别 BHb,在最佳条件下,荧光强度线性下降,检出限可达 17.3nmol/L。这对快速识别和灵敏检测实际样品中的痕量蛋白提供了一种方便的方法。

MPIPs 在蛋白分离中的应用较为广泛。例如,Zhang 等^[69]通过表面印迹技术制备了 Lyz 的磁性分子印迹聚合物,用于人尿中 Lyz 的选择性识别和磁性分离。Turan^[70]采用抗原决定基印迹技术,选用甲基丙烯酸 3-(三甲氧基甲硅烷基)丙基酯、NIPAM 和丙烯酸铜为功能单体,制备了 His-Tag 磁性印迹纳米颗粒。这种印迹材料对甲状腺过氧化物酶抗原具备特异性识别和亲和力,可以快速分离全血样品中的靶抗原。

MPIPs 在免疫分析领域也有一定的应用。He 等^[71]以日本脑炎病毒为模板分子,通过表面印迹法在 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ 微球表面实现了印迹材料的合成。这种印迹微球不仅可以利用病毒衣壳的荧光性进行高灵敏度的检测,还对日本脑炎病毒具有良好的选择识别性。Zhang 等^[72]选用甲型肝炎病毒和多巴胺分为模板分子和功能单体,在 Fe_3O_4 微球表面制备了印迹聚合物。借助磁共振光散射技术,该法制备的印迹材料可以特定识别痕量的甲型肝炎病毒,检出限低至 6.2pmol/L,并成功应用于稀释 2000 倍的人血清中甲型肝炎病毒的即时检测。

4 结束语

相对于天然生物材料,蛋白印迹聚合物具有价格低廉、易于合成、重复性好及在苛刻条件下稳定性高等优点。与磁性微球复合后,印迹材料能够实现快速分离和回收,提高使用效率,在蛋白分离、免疫分析和生物传感等领域有广阔的应用前景。

目前,虽然为提高磁性蛋白印迹复合微球的印迹和特异识别性能已经提出了多种可行且实用的策略,例如,引入结构合理的刺激响应性聚合物、优化磁性载体微球的表面功能性、接枝抗蛋白链段以降低蛋白非特异性吸附等。但由于蛋白分子构象灵活、体积庞大、表面活性高,印迹聚合物的制备过程中存在部分模板蛋白变性的问题,致使印迹位点不足或印迹腔内官能团分布的不准确。此外,印迹聚合物的合成及识别机理仍处于探索中,对蛋白分子与印迹材料相互作用的研究依旧存在一定程度的挑战。基于上述原因,虽然磁性微球与蛋白印迹聚合物复合后提高了其对蛋白的识别能力和选择性,但和传统蛋白层析材料相比,其分离能力仍需要进一步提升,实现印迹材料的高特异性及产业化仍然任重道远。为此,在提升磁性蛋白印迹复合微球性能的同时,应充分结合产业化要求,使印迹材料能够合理应用并解决生物领域中的实际问题。

参考文献:

- [1] Chen L, Wang X, Lu W, Wu X, Li J. *Chem Soc Rev*, 2016, 45 (8): 2137~2211.
- [2] Boitard C, Bée A, Ménager C, Griffete N. *J Mater Chem B*, 2018, 6 (11): 1563~1580.
- [3] Chen H, Kong J, Yuan D, Fu G. *Biosens Bioelectron*, 2014, 53: 5~11.
- [4] Ge Y, Turner A P. *Trends Biotechnol*, 2008, 26 (4): 218~224.
- [5] Li S, Yang K, Liu J, Jiang B, Zhang L, Zhang Y. *Anal Chem*, 2015, 87 (9): 4617~4620.
- [6] Li Q, Yang K, Li S, Liu L, Zhang L, Liang Z, Zhang Y. *Microchim Acta*, 2015, 183 (1): 345~352.
- [7] Zhao L, Zhao F, Zeng B. *Biosens Bioelectron*, 2014, 60: 71~76.
- [8] Li X, Zhou J, Tian L, Li W, Zhang B, Zhang H, Zhang Q. *J Sep Sci*, 2015, 38 (19): 3477~86.
- [9] Chen J, Lei S, Xie Y, Wang M, Yang J, Ge X. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2015, 7 (51): 28606~28615.
- [10] Gai Q Q, Qu F, Zhang T, Zhang Y K. *J Chromatogr A*, 2011, 1218 (22): 3489~3495.
- [11] Gao R, Mu X, Hao Y, Zhang L, Zhang J, Tang Y. *J Mater Chem B*, 2014, 2 (12): 1733~1741.
- [12] Li D Y, Zhang X M, Yan Y J, He X W, Li W Y, Zhang Y K. *Biosens Bioelectron*, 2016, 79: 187~92.
- [13] Li J, Fu J, Yang Q, Wang L, Wang X, Chen L. *Analyst*, 2018, 143 (15): 3570~3578.
- [14] Liu Y, Liu L, He Y, He Q, Ma H. *Biosens Bioelectron*, 2016, 77: 886~893.
- [15] Xu S, Lu H. *Chem Commun*, 2015, 51 (15): 3200~3203.
- [16] Li L, He X, Chen L, Zhang Y. *Chem Asian J*, 2009, 4 (2): 286~293.
- [17] Zhu H, Yao H, Xia K, Liu J, Yin X, Zhang W, Pan J. *Chem Eng J*, 2018, 346: 317~328.
- [18] Yan Y J, He X W, Li W Y, Zhang Y K. *Biosens Bioelectron*, 2017, 91: 253~261.
- [19] Xu K, Wang Y, Wei X, Chen J, Xu P, Zhou Y. *Microchim Acta*, 2018, 185 (2): 146.
- [20] Canfarotta F, Lezina L, Guerreiro A, Czulkaj J, Petukhov A, Daks A, Smolinska-Kempisty K, Poma A, Piletsky S, Barlev N A. *Nano Lett*, 2018, 18 (8): 4641~4646.
- [21] Ding S, Li Z, Cheng Y, Du C, Gao J, Zhang Y W, Zhang N, Li Z, Chang N, Hu X. *Nanotechnology*, 2018, 29 (37): 375604.
- [22] Yang Y Q, He X W, Wang Y Z, Li W Y, Zhang Y K. *Biosens Bioelectron*, 2014, 54: 266~272.
- [23] Rachkov A. *Biochim Biophys Acta*, 2001, 1544: 255~266.
- [24] Zhang X, Zhang N, Du C, Guan P, Gao X, Wang C, Du Y, Ding S, Hu X. *Chem Eng J*, 2017, 317: 988~998.
- [25] Halperin A, Kroger M, Winnik F M. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2015, 54 (51): 15342~15367.
- [26] Zhang W, He X W, Li W Y, Zhang Y K. *Chem Commun*, 2012, 48 (12): 1757~1759.
- [27] Li S, Yang K, Deng N, Min Y, Liu L, Zhang L, Zhang Y. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2016, 8 (9): 5747~5751.
- [28] Pan G, Zhang Y, Guo X, Li C, Zhang H. *Biosens Bioelectron*, 2010, 26 (3): 976~982.
- [29] Zhang X, Li H, Kang J, Zhu X, Peng W, Zhou H, Zhong S, Wang Y. *Colloids Surfaces A: Physicochem Eng Asp*, 2016, 504: 367~375.
- [30] Ji S, Li N, Shen Y, Li Q, Qiao J, Li Z. *Anal Chim Acta*, 2016, 909: 60~66.
- [31] Li N, Qi L, Shen Y, Qiao J, Chen Y. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2014, 6 (19): 17289~17295.
- [32] Xu S, Lu H, Zheng X, Chen L. *J Mater Chem C*, 2013, 1 (29): 4406.
- [33] Xie J, Zhong G, Cai C, Chen C, Chen X. *Talanta*, 2017, 169: 98~103.
- [34] Fan J P, Yu J X, Yang X M, Zhang X H, Yuan T T, Peng H L. *Chem Eng J*, 2018, 337: 722~732.
- [35] Wei Y B, Tang Q, Gong C B, Lam M H. *Anal Chim Acta*, 2015, 900: 10~20.

- [36] Xie X, Hu Q, Ke R, Zhen X, Bu Y, Wang S. J C E J, 2019, 371: 130~137.
- [37] Chen J, Lei S, Xie Y, Wang M, Yang J, Ge X. ACS Appl Mater Interfaces, 2015, 7 (51): 28606~28615.
- [38] Liu Y, Ai K, Liu J, Deng M, He Y, Lu L. Adv Mater, 2013, 25 (9): 1353~1359.
- [39] Lin L S, Cong Z X, Cao J B, Ke K M, Peng Q L, Gao J, Yang H H, Liu G, Chen X. ACS Nano, 2014, 8 (4): 3876~3883.
- [40] Li X, Zhang B, Li W, Lei X, Fan X, Tian L, Zhang H, Zhang Q. Biosens Bioelectron, 2014, 51: 261~267.
- [41] Zhou J, Wang Y, Ma Y, Zhang B, Zhang Q. Appl Surface Sci, 2019, 486: 265~273.
- [42] Li X, Zhou J, Tian L, Li W, Ali Z, Ali N, Zhang B, Zhang H, Zhang Q. Sensors Actuators B: Chem, 2016, 225: 436~445.
- [43] Dong X, Ma Y, Hou C, Zhang B, Zhang H, Zhang Q. Polym Int, 2019, 68 (5): 955~963.
- [44] Wang Y, Zhou J, Zhang B, Tian L, Ali Z, Zhang Q. Chem Eng J, 2017, 327: 932~940.
- [45] Wang Y, Zhou J, Wu C, Tian L, Zhang B, Zhang Q. J Mater Chem B, 2018, 6 (37): 5860~5866.
- [46] Fu G, He H, Chai Z, Chen H, Kong J, Wang Y, Jiang Y. Anal Chem, 2011, 83 (4): 1431~1436.
- [47] Guo H, Yuan D, Fu G. J Colloid Interface Sci, 2015, 440: 53~59.
- [48] Hao Y, Gao R, Liu D, He G, Tang Y, Guo Z. Talanta, 2016, 153: 211~220.
- [49] Shoghi E, Mirahmadi-Zare S Z, Ghasemi R, Asghari M, Poorebrahim M, Nasr-Esfahani M H. Mikrochim Acta, 2018, 185 (4): 241.
- [50] Zhang N, Hu X, Guan P, Du C, Li J, Qian L, Zhang X, Ding S, Li B. Chem Eng J, 2017, 317: 356~367.
- [51] Wang C, Hu X, Guan P, Qian L, Wu D, Li J. Int J Polym Anal Charact, 2014, 19 (1): 70~82.
- [52] Qian L, Hu X, Guan P, Gao B, Li J, Wang C, Tang Y. Talanta, 2014, 121: 56~64.
- [53] Wang Y, Han M, Liu G, Hou X, Huang Y, Wu K, Li C. Biosens Bioelectron, 2015, 74: 792~798.
- [54] Qian L, Sun J, Hou C, Yang J, Li Y, Lei D, Yang M, Zhang S. Talanta, 2017, 168: 174~182.
- [55] Dai Q, Wang Y, Xu W, Liu Y, Zhou Y. Microchim Acta, 2017, 184 (11): 4433~4441.
- [56] Liu S, Chen H, Lu X, Deng C, Zhang X, Yang P. Angew Chem Int Ed Engl, 2010, 49 (41): 7557~7561.
- [57] Zhang M, Cheng D, He X, Chen L, Zhang Y. Chem Asian J, 2010, 5 (6): 1332~1340.
- [58] Li W, Sun Y, Yang C, Yan X, Guo H, Fu G. ACS Appl Mater Interfaces, 2015, 7 (49): 27188~27196.
- [59] Qin Y P, Jia C, He X W, Li W Y, Zhang Y K. ACS Appl Mater Interfaces, 2018, 10 (10): 9060~9068.
- [60] Qin L, He X W, Zhang W, Li W Y, Zhang Y K. Anal Chem, 2009, 81 (17): 7206~7216.
- [61] Kartal F, Denizli A. J Sep Sci, 2014, 37 (15): 2077~2086.
- [62] Shi L, Tang Y, Hao Y, He G, Gao R, Tang X. J Sep Sci, 2016, 39 (14): 2876~2883.
- [63] Li X, Zhang B, Tian L, Li W, Xin T, Zhang H, Zhang Q. Sensors Actuators B: Chem, 2014, 196: 265~271.
- [64] Li X, Zhang B, Tian L, Li W, Zhang H, Zhang Q. Sensors Actuators B: Chem, 2015, 208: 559~568.
- [65] Li X, Zhou J, Tian L, Wang Y, Zhang B, Zhang H, Zhang Q. Sensors Actuators B: Chem, 2017, 241: 413~421.
- [66] Wang Y, Zhou J, Gu H, Jia X, Su K, Zhang B, Zhang Q. Macromol Mater Eng, 2019, 304 (4): 1800731.
- [67] Sun B, Ni X, Cao Y, Cao G. Biosens Bioelectron, 2017, 91: 354~358.
- [68] Lü P, Xie D, Zhang Z. Talanta, 2018, 188: 145~151.
- [69] Zhang Z., Wang H, Wang H, Wu C, Li M, Li L. Analyst, 2018, 143 (23): 5849~5856.
- [70] Turan E. ChemistrySelect, 2018, 3 (42): 11963~11969.
- [71] He K, Chen C, Liang C, Liu C, Yang B, Chen X, Cai C. Sensors Actuators B: Chem, 2016, 233: 607~614.
- [72] Zhang F, Luo L, Gong H, Chen C, Cai C. RSC Adv, 2018, 8 (56): 32262~32268.

Research Progress of Magnetic Protein-imprinted Composite Microspheres

ZHOU Jing-jing¹, WANG Yu-fei¹, HU Xiao-ling¹, ZHANG Qiu-yu^{1, 2*}

(1. *Department of Chemistry, University of Northwestern Polytechnical, Xi'an 710129, China;*

2. *Research & Development Institute of Northwestern Polytechnical University in Shenzhen, Shenzhen 518057, China*)

Abstract: Magnetic protein-imprinted composite microspheres (MPIPs) have important application value in protein separation and detection owing to their specific recognition and efficient separation of target proteins. However, due to the structural properties of protein molecules, magnetic imprinted materials still face many challenges on improving their preparation and performance. This paper reviews the progress in preparation methods of MPIPs and the design strategies for improving their imprinting efficiency. And the applications of MPIPs in the fields, such as, protein separation, immunoassay and biosensing are also summarized.

Key words: Protein imprinting; Magnetic composite microspheres(MPIPs); Separation efficiency; Specific recognition