

基于 GMA-IDA-Cu²⁺ 螯合作用 识别 BSA 的温敏印迹聚合物

董祥芝^{1,2}, 马 勇¹, 侯春平¹, 张宝亮¹, 张和鹏¹, 张秋禹^{1*}

(1.西北工业大学理学院, 陕西 西安 710072;

2.西安工程大学环境与化学工程学院, 陕西 西安 710048)

摘要:在改性 SiO₂ 表面接枝聚合 GMA-ID-Cu²⁺后,再与温敏单体(NIPAM)共聚合成温敏型分子印迹聚合物(MIP),并利用 GMA-IDA-Cu²⁺金属螯合作用对模板蛋白 BSA 进行选择吸附。通过 TEM、IR 和 TGA 测试表明,印迹层已接枝在 SiO₂ 外层,且印迹层厚度约 9 nm。pH 和温度条件的优化试验表明,MIP 具有优异的温度敏感性,并在 pH 为 4.6 时获得较高的吸附容量(115.42 mg/g)和印迹因子(2.58)。对不同蛋白质的特异性吸附试验说明,MIP 内部的印迹空腔和印迹位点与模板蛋白 BSA 相互匹配。同时 MIP 具有较高的吸附速率和较好的重复性。

关键词:温敏;分子印迹聚合物;螯合作用;牛血清白蛋白;吸附性能

中图分类号:O658

文献标志码:A

文章编号:0253-4320(2020)01-0134-06

DOI:10.16606/j.cnki.issn.0253-4320.2020.01.029

Thermo-sensitive MIP for recognition of bovine serum albumin based on chelating performance of GMA-IDA-Cu²⁺

DONG Xiang-zhi^{1,2}, MA Yong¹, HOU Chun-ping¹, ZHANG Bao-liang¹,
ZHANG He-peng¹, ZHANG Qiu-yu^{1*}

(1.School of Natural and Applied Sciences, Northwestern Polytechnical University, Xi'an 710072, China;

2.School of Environmental and Chemical Engineering, Xi'an Polytechnic University,
Xi'an 710048, China)

Abstract:A thermo-sensitive molecularly imprinted polymer (MIP) is synthesized through graft copolymerization of "whisker" polymer chains on the surface of modified SiO₂ and then copolymerization with thermo-sensitive monomers (NIPAM).The template protein bovine serum albumin (BSA) is selectively adsorbed by GMA-IDA-Cu²⁺ by means of metal chelation.TEM,IR and TGA measurements prove that the imprinted layer has been grafted onto SiO₂ outer layer, and the thickness of the imprinted layer is around 9 nm.The optimum experiments for pH and thermo-sensitive conditions verify that MIP has an excellent temperature sensitivity.An adsorption capacity as high as 115.42 mg·g⁻¹ and an imprinting factor of 2.58) are obtained at pH 4.6.Specific adsorption tests for different proteins show that the imprinted cavities and imprinted sites inside the MIP match well with the template protein BSA.In addition,the MIP also exhibits higher adsorption rate and better repeatability.

Key words: thermo-sensitivity; molecular imprinting polymer; chelation; bovine serum albumin; adsorption properties

从复杂基质中有效分离目标分子是分析化学领域的重要研究方向。受抗原和抗体之间特异性识别的启发,分子印迹技术应运而生^[1],其原理主要是将模板分子与功能单体共聚后,再将模板去除得到分子印迹聚合物(molecular imprinted polymers, MIP)。MIP 内部空腔的大小和官能团排布与模板分子完全互补,能从复杂基质中有效识别模板分子^[2-3]。因生物大分子分子质量大、水溶性差且构象易变性等导致的印迹困难^[4-5],可采取表面印迹

法将印迹位点修饰于载体表面^[6-9],便于大分子的蛋白与位点结合;或在载体表面接枝共聚须状或树枝状大分子,避免大分子结构的变形^[10-14]。针对表面有裸露组氨酸的蛋白质,利用金属离子与蛋白质的配位作用,能有效提高吸附容量^[15-17]。另外,温敏型印迹材料受环境温度影响可实现对模板蛋白的可控吸附/洗脱而备受关注^[18-19]。其中,聚异丙基丙烯酰胺(poly-isopropylacrylamide, PNIPAM)同时含有亲水酰胺基和疏水异丙基,最低临界溶解温度

收稿日期:2019-03-19;修回日期:2019-11-05

基金项目:国家自然科学基金国家重点项目(51433008);国家自然科学基金国家重点项目(51873169);国家自然科学基金(21704084);国际合作与交易所国家自然科学基金(51711530233);中央大学基础研究基金(3102017jc01001)

作者简介:董祥芝(1984-),女,硕士,工程师,研究方向为环境响应型蛋白质分子印迹材料的合成与性能研究,dongxz6566@foxmail.com;张秋禹(1965-),女,博士,教授,主要从事纳米高分子复合材料的研究工作,通讯联系人,qzhang@nwpu.edu.cn。

(Lower Critical Solution Temperature, *LCST*) 在 32℃ 左右,是常用的热敏单体^[20-21]。

笔者在纳米二氧化硅的表面接枝共聚长链的 GMA-IDA,并与金属 Cu²⁺ 螯合,以牛血清白蛋白 BSA 为模板,与温敏功能单体 NIPAM 和交联剂 MBA 共聚,合成新型的温敏蛋白质分子印迹聚合物,并对其性能进行考察。

1 实验材料与仪器

1.1 实验材料

四硅酸乙酯 (TEOS)、过硫酸铵 (APS)、四甲基乙二胺 (TEMED)、甲基丙烯酸 (MAA)、甲基丙烯酸缩水甘油酯 (GMA)、亚氨基二乙酸 (IDA)、硝酸铯铵 (CAN)、五水硫酸铜 (CuSO₄·5H₂O) 和 *N,N*-甲基双丙烯酰胺 (MBA), 国药集团化学试剂有限公司生产; *N*-异丙基丙烯酰胺 (NIPAM)、 γ -(2,3-环氧丙氧基)丙基三甲氧基硅烷 (GPTMS), 阿拉丁试剂公司生产; 牛血清白蛋白 (BSA)、人血清白蛋白 (HSA)、卵清蛋白 (OVA)、牛血红蛋白 (BHb)、溶菌酶 (Lyz), 上海蓝季生物科技有限公司生产。NIPAM 在使用前用正己烷重结晶。其他试剂均为国产分析纯试剂,实验用水为去离子水。

1.2 实验仪器

JEOL JEM-2100Plus 透射电子显微镜 (TEM), 日本电子株式会社生产; MiniFlex 600 型 X 射线衍射仪 (XRD), 日本 Rigaku 公司生产; Nicolet-5700 型红外光谱仪 (IR), 美国 Thermo Fisher 公司生产; TG/TGA 851° 热重分析仪 (TGA), 瑞士 Mettler Toledo 公司生产; UV2450 紫外分光光度计 (UV), 日本岛津公司生产; 5810R 超高速离心机, 德国 Eppendorf 公司生产。

2 实验方法

2.1 印迹聚合物的制备

首先将 IDA 用 NaOH 中和成亚氨基二乙酸钠盐, 再将 IDA-2Na⁺ 溶液缓慢加入到 GMA 单体中 (摩尔比为 1:1), 混合溶液在 60℃ 下剧烈搅拌 2 h 后得到 GMA-IDA 单体, 合成路线如图 1 所示。

参照文献^[22]中所述的方法合成 SiO₂ 并进行 GPTMS 改性。将 200 mL 乙醇、22 mL 去离子水和 12 mL 25% 氨水溶液的混合物在 30℃ 下剧烈搅拌的同时逐滴加入 12 mL TEOS, 反应 24 h。然后再逐滴加入 4 mL GPTMS, 继续搅拌 24 h 即得到 GPTMS 改性 SiO₂ 颗粒 (SiO₂-GMPTS)。将产物用乙醇和水反

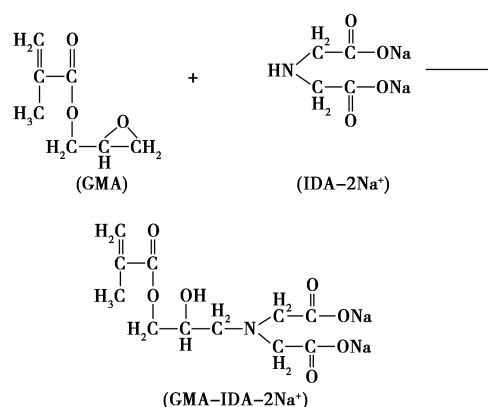


图 1 GMA-IDA 单体的合成示意图

复清洗后,加入 100 mL 0.5 mol/L H₂SO₄ 后于 90℃ 下继续反应 2 h,使环氧基水解成二醇基团。将产物洗至中性后与 5 mL 0.1 mol/L CAN (溶于 1 mol/L HNO₃ 溶液中) 60℃ 通氮气反应 1 h,再加入 5 mL GMA-IDA 单体,继续反应 4 h。反应结束后,用去离子水反复洗涤后得到 SiO₂-GMA-IDA。

取 300 mg SiO₂-GMA-IDA 加入 10 mL 0.02 mol/L PBS 溶液中,再加入 1.14 mg CuSO₄·5H₂O、112.4 mg NIPAM、78 mg MBA、0.2 mL MAA 和 30 mg BSA,通 N₂ 混合 60 min 后,加入 10 mg APS 和 10 μL TEMED 引发聚合,35℃ 下剧烈搅拌 24 h (合成过程如图 2 所示)。得到的聚合物用含 10% SDS 的 10% 乙酸溶液反复洗脱,直至洗脱液在 278 nm 波长无紫外吸收为止,此时模板分子 BSA 已被完全去除。再将聚合物洗至中性后室温下真空干燥。

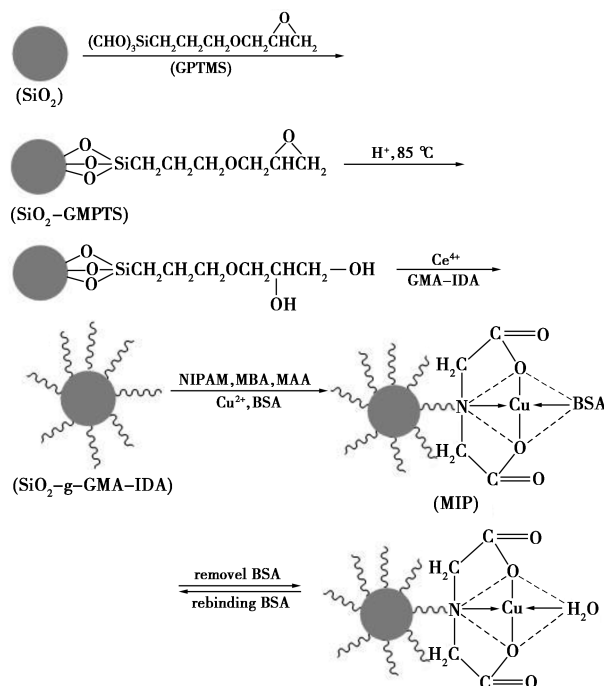


图 2 印迹聚合物的合成示意图

非印迹聚合物(Non-molecular imprinted polymers, NIP)的制备和洗脱方法同上,但是不加模板蛋白 BSA。

2.2 吸附性能的检测

将 10.0 mg MIP (NIP) 加入离心管中,加入 5 mL 0.6 mg/mL 的 BSA 溶液,在 35℃ 下振荡吸附 4 h 后,离心取上清液进行 278 nm 处的紫外检测。

吸附容量 Q (mg/g) 计算式为:

$$Q = [(C_0 - C)V]/m \quad (1)$$

其中: C_0 为 BSA 溶液的初始质量浓度, mg/mL; C 为上清液的 BSA 质量浓度, mg/mL; V 为 BSA 溶液的体积, mL; m 为 MIP (NIP) 的质量, g。

MIP 对模板蛋白的特异性印迹因子 (IF) 为:

$$IF = Q_{MIP}/Q_{NIP} \quad (2)$$

式中: Q_{MIP} 和 Q_{NIP} 分别为 MIP 和 NIP 的吸附容量。

3 结果和讨论

3.1 印迹聚合物的合成和结构表征

印迹层的厚度对吸附容量有一定的影响^[12-14,23],过薄时位点与模板无法完全匹配,过厚时位阻效应增大。因此在载体表面聚合树枝状或须状大分子可增加印迹的有效空间和灵活度^[13-14]。另外,模板 BSA 表面有 1~3 个裸露的组氨酸,可通过金属离子的螯合作用来增加 MIP 与 BSA 的结合力。因此在试验中设计了 GMA-IDA-Cu²⁺ 的长链,并与温敏性单体 NIPAM 共聚制备高吸附的温敏型 MIP。SiO₂-GPTMS、SiO₂-GMA-IDA、MIP 及 NIP 的 TEM 图如图 3 所示。

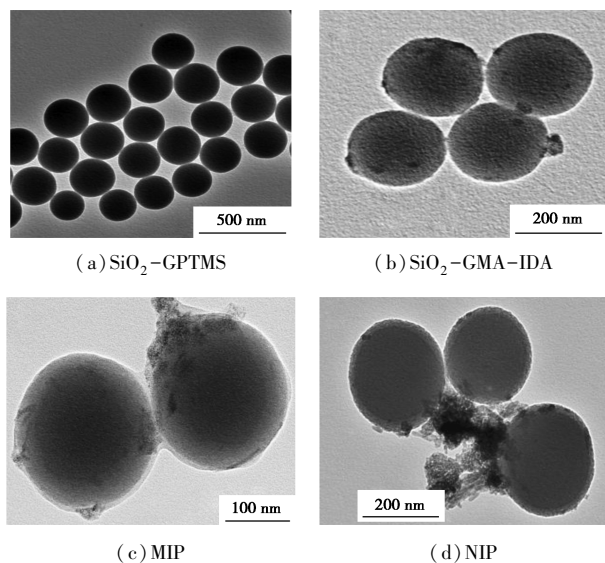
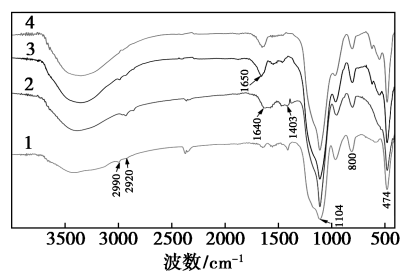


图 3 SiO₂-GPTMS、SiO₂-GMA-IDA、MIP 及 NIP 的 TEM 图

从图 3(a)中可以看出,经改性后的纳米粒子具有较好的分散性,平均直径约 219 nm。从图 3(b)中可以看出,接枝 GMA-IDA 后,粒子表面变粗糙,且直径增加到 226 nm。从图 3(c)和图 3(d)中可以看出,聚合后的 MIPs 和 NIPs 直径进一步增加至 244 nm 和 240 nm。从图 3(c)也可以清楚的看到在 MIP 的表面有一层厚度约为 9 nm 的印迹层,对 BSA 的识别较为适宜^[24]。

SiO₂-GPTMS、SiO₂-GMA-IDA、MIP 和 NIP 的红外谱图如图 4 所示。

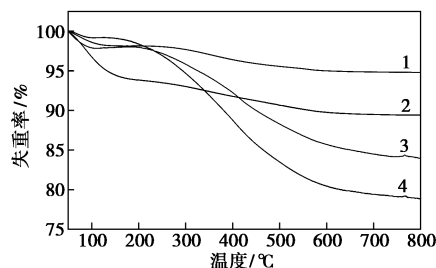


1—SiO₂-GPTMS; 2—SiO₂-GMA-IDA; 3—MIP; 4—NIP

图 4 SiO₂-GPTMS、SiO₂-GMA-IDA、MIP 和 NIP 的红外谱图

由图 4 中可以看出,1 105、804、470 cm⁻¹为 Si—O—Si 的特征峰,3 400 cm⁻¹为—OH 的特征峰。由图 4 中谱线 1 可以看出,2 990 cm⁻¹和 2 920 cm⁻¹分别为 SiO₂-GMPTS 中—CH₃ 和—CH₂—的特征峰。由图 4 中谱线 2 可以看出,接枝 GMA-IDA 后,1 700~1 400 cm⁻¹处的峰强度增大,对应 GMA-IDA 单体中—COO—的对称和反对称伸缩振动峰。由图 4 中谱线 3、谱线 4 可以看出,MIP 和 NIP 中 1 650 cm⁻¹处的峰进一步增强,这是 NIPAM 中酰胺基吸收峰叠加后的结果。

SiO₂、SiO₂-GMPTS、MIP、NIP 的热失重图见图 5。



1—SiO₂-GPTMS; 2—SiO₂-GMA-IDA; 4—MIP; 3—NIP

图 5 SiO₂、SiO₂-GMPTS、MIP、NIP(C) 的热失重图

由图 5 中可以看出, SiO₂-GPTMS 的失重率高于 SiO₂,这是由其表面 GPTMS 受热分解所致。MIP 和 NIP 的失重率分别为 21.13% 和 16.07%,说明两

者的印迹壳层厚度不一致。综合TEM、FT-IR和TGA的分析结果可知,蛋白印迹层已成功地接枝在SiO₂表面。

3.2 环境pH和温度对吸附容量的影响

电荷作用影响印迹位点与酶或蛋白质的结合能力。因此,分别配制不同pH(4.6、6.0、7.0、8.0和9.0)的0.6 mg/mL BSA溶液评价pH的影响。鉴于印迹层中NIPAM的温敏特性,在35℃和25℃下分别考察pH对吸附容量的影响,结果如表1所示。从表1中可以看出,MIP和NIP在35℃的吸附容量均大于25℃,说明聚合物具有良好的温敏性。pH较低时,吸附能力良好,随着pH的增大,吸附容量下降。这是因为BSA的等电点是4.9,在pH=4.6时,BSA带正电荷;MIP因有配位水分子的去质子作用而带负电。因此BSA受配位作用和静电作用的双重影响而迅速接近MIP,再通过印迹位点的氢键作用与之结合。当pH大于BSA的等电点时,BSA带负电,电荷排斥作用增强,使得吸附容量有所下降。

表1 35℃和25℃下不同pH对MIP和NIP吸附性能的影响

pH	35℃时的吸附容量 $Q/(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$		25℃时的吸附容量 $Q/(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$	
	MIP	NIP	MIP	NIP
	4.6	115.09±10.51	42.21±8.47	75.28±7.47
6.0	77.94±8.36	39.54±5.04	44.14±6.29	27.87±6.35
7.0	58.25±7.09	32.53±12.32	29.06±7.91	24.70±3.99
8.0	51.01±7.70	19.97±3.79	22.99±9.41	20.01±4.07
9.0	54.41±6.62	22.84±6.18	19.77±5.48	20.61±3.57

在20~40℃之间选取多个温度点考察聚合物的温敏性,结果如表2所示。由表2可以看出,NIPAM的LCST在32℃左右时,PNIPAM链舒展,印迹空腔受其影响扩张变形,温度越低变形程度越大。20℃时的吸附容量最小,说明此时位点与BSA的结合能力最弱。随温度的升高,空腔逐步收缩,与BSA的匹配度及结合力增强,吸附容量逐步增加。在35℃时获得较大的吸附容量,这是因为此时空腔形状和位点与BSA的匹配度最佳。当温度增至40℃时,吸附容量下降严重,这是因为PNIPAM链的收缩使印迹空腔变形,难以与BSA结合。NIP的吸附量随温度的变化趋势与MIP基本一致,但因其内部没有与

BSA匹配的印迹空腔,因此变化幅度不大。因此,选定35℃和pH 4.6为最佳的条件进行后续实验。另外,试验中发现MIP的吸附容量均大于NIP的吸附容量,说明尽管配位作用、静电作用和疏水作用对蛋白质的吸附有一定影响,但印迹空腔和位点仍起决定作用。

表2 MIP和NIP在不同温度下对BSA吸附容量比较

温度/℃	吸附容量 $Q/(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$	
	MIP	NIP
20	47.96±2.00	25.10±4.51
25	50.28±1.74	28.58±5.42
30	75.28±7.47	36.45±4.10
35	115.09±10.51	42.21±8.47
40	56.93±4.37	38.13±1.74

3.3 等温吸附和吸附动力学研究

配制初始质量浓度为0.1~1.0 mg/mL的BSA溶液来研究印迹聚合物的饱和吸附容量,并用Langmuir吸附方程对等温吸附线进行处理,方程如下:

$$C_0/Q = C_0/Q_{\max} + 1/KQ_{\max} \quad (3)$$

其中: Q 和 Q_{\max} 分别为实验吸附容量和理论最大吸附容量,mg/g; C_0 为蛋白质在平衡溶液中的质量浓度,mg/mL; K 为Langmuir吸附平衡常数。

MIP和NIP的等温吸附曲线如图6所示。

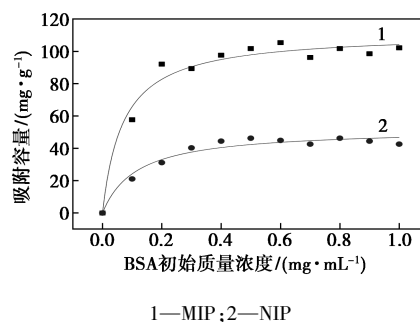


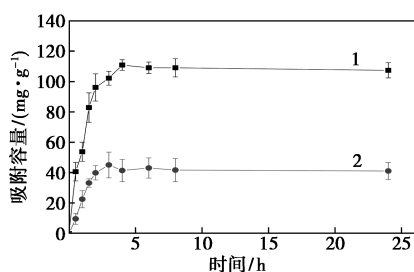
图6 MIP和NIP的等温吸附曲线

从图6中可以看出,MIP的吸附容量随BSA初始质量浓度的增加而增大,在BSA初始质量浓度为0.1~0.4 mg/mL时吸附容量急剧增长,在BSA初始质量浓度为0.6 mg/mL后吸附容量趋于稳定。NIP因没有印迹位点,在0.4 mg/mL时即达到饱和。Langmuir吸附方程求得的参数值如表3所示。从表3中可知,在0.6 mg/mL时,MIP的 K 和 Q_{\max} 均明显大于NIP,表明MIP具有较高的吸附选择性和吸附容量。

表 3 Langmuir 吸附方程求得的参数值

样品	$Q/(mg \cdot g^{-1})$	$K/(mL \cdot mg^{-1})$	$Q_{max}/(mg \cdot g^{-1})$	R
MIP	105.31	14.41	111.34	0.9849
NIP	44.87	8.69	52.07	0.9787

将 10.0 mg 印迹聚合物与 5 mL 0.6 mg/mL 的 BSA 溶液于 35℃ 下振荡吸附, 间隔一定时间监测吸附容量并绘制吸附动力学曲线, 结果如图 7 所示。由图 7 可以看出, MIP 的吸附容量迅速增加, 4 h 后达到平衡, 这是因为溶液中 BSA 通过静电吸引和配位作用迅速传递到 MIP 表面并占据结合位点。NIP 的变化趋势与之相似, 但吸附容量明显低于 MIP。



1—MIP; 2—NIP

图 7 MIP 和 NIP 的吸附动力学曲线

3.4 选择性吸附和竞争性吸附

以 BHB、HSA、OVA 和 Lyz 为竞争蛋白, 考察 MIP 和 NIP 的选择性, 结果如表 4 所示。在 pH 为 4.6 时, 选取的竞争蛋白均带正电荷。

表 4 MIP 和 NIP 对不同蛋白质的吸附性能

蛋白质	分子质量 M_w / (kDa)	等电点 PI	吸附容量 Q / (mg·g ⁻¹)		吸附因子 IF	选择因子 β
			MIP	NIP		
BSA	66	4.9	115.42	41.63	2.58	—
BHB	68	6.8	34.24	25.94	1.32	1.95
HSA	66	4.7~4.9	45.78	30.36	1.51	1.71
OVA	43	4.7	56.28	37.92	1.48	1.74
Lyz	14.3	11	61.88	41.75	1.48	1.74

BHB 与 BSA 分子质量相似, 但 BSA 为椭圆形, BHB 为双凹形, 且两者的等电点也不同。BHB 在配位作用和静电作用的影响下会接近印迹位点, 但因空间取向与印迹空穴不匹配, 受位阻效应影响难以进入结合位点, 因此其吸附容量较低。HSA 是由 3 个结构相似的 α -螺旋结构域组成的心形分子, 同样

因印迹空腔的不匹配得到较低的吸附容量。OVA 和 Lyz 分子质量比 BSA 小, 在配位作用和静电作用的影响下会接近印迹位点并与其结合, 但因印迹位点的不适宜、结合力较弱, 得到的吸附容量也不高。同时对这些竞争蛋白的吸附因子 IF 也表明, MIP 和 NIP 对这些竞争蛋白的吸附选择性较差。另外, 常用选择性因子 β 来评价分子印迹聚合物的特异性, 定义如下:

$$\beta = IF_{tem}/IF_{com} \quad (4)$$

其中: IF_{tem} 和 IF_{com} 分别为聚合物对模板蛋白和竞争蛋白的印迹因子。

从表 4 中可知, 印迹聚合物对模板蛋白的特异性识别性能较好, 说明印迹聚合物内部空腔的大小及官能团的分布是影响印迹效果的重要因素。

3.5 重复性

重复性是评价分子印迹聚合物性能的一个重要指标。将同一批 MIP 经历吸附-洗脱的流程重复实验 6 次并记录每次的吸附容量, 结果如表 5 所示。由表 5 中可以看出, MIP 的吸附容量随循环次数的增加而下降, 这是因为洗脱过程中破坏了部分印迹空腔和位点所致。6 次循环后 MIP 的吸附容量降为初始的 73%, 重复性较好。而 NIP 内没有特异的结合位点, 因此吸附容量几乎不变。

表 5 MIP 和 NIP 的重复性

循环次数	$Q/(mg \cdot g^{-1})$	
	MIP	NIP
1	115.42	41.63
2	105.00	36.42
3	94.58	35.56
4	91.98	38.16
5	89.38	39.89
6	83.29	33.82

4 结论

在改性硅胶 SiO_2 -GPTMS 表面接枝 GMA-IDA 高分子链, 与 NIPAM 温敏单体共聚, 合成基于 GMA-IDA-Cu²⁺ 金属螯合作用的温敏分子印迹聚合物。实验结果表明, 印迹聚合物不仅具有良好的温敏性, 而且具有较高的吸附容量。另外, 印迹聚合物对不同蛋白质的吸附性能表明, 印迹聚合物内部的印迹空腔和印迹位点对蛋白质的吸附起决定作用。

参考文献

- [1] 王晓艳,李金花,陈令新.分子印迹材料的先进制备技术与策略[J].科学通报,2019,64:1352-1367.
- [2] Karsten H, Klaus M. Molecularly imprinted polymers and their use in biomimetic sensors[J]. Chem Rev, 2000, 100: 2495-2504.
- [3] Li X J, Zhang B L, Li W, *et al.* Preparation and characterization of bovine serum albumin surface imprinted thermosensitive magnetic polymer microsphere and its application for protein recognition[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2014, 51: 261-267.
- [4] Kryscio D R, Peppas N A. Critical review and perspective of macro-molecularly imprinted polymers[J]. Acta Biomater, 2012, 8: 461-473.
- [5] Ellen V, Joris P S, Martin van W, *et al.* Challenges for the effective molecular imprinting of proteins[J]. Biomaterials, 2011, 32: 3008-3020.
- [6] Yang H H, Zhang S Q, Tan F, *et al.* Surface molecularly imprinted nanowires for biorecognition[J]. J Am Chem Soc, 2005, 127: 1378-1379.
- [7] Li X J, Zhou J J, Tian L, *et al.* Preparation of anti-nonspecific adsorption polydopamine-based surface protein-imprinted magnetic microspheres with the assistance of 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine and its application for protein recognition[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2017, 241: 413-421.
- [8] Wang Y F, Zhou J J, Zhang B L, *et al.* Fabrication and characterization of glutathione-imprinted polymers on fibrous SiO₂ microspheres with high specific surface[J]. Chem Eng J, 2017, 327: 932-940.
- [9] Lin Z A, Xia Z W, Zheng J N, *et al.* Synthesis of uniformly sized molecularly imprinted polymer-coated silica nanoparticles for selective recognition and enrichment of lysozyme[J]. J Mater Chem, 2012, 22: 17914-17922.
- [10] He P Y, Zhu H J, Ma Y, *et al.* Rational design and fabrication of surface molecularly imprinted polymers based on multi-boronic acid sites for selective capture glycoproteins[J]. Chemical Engineering Journal, 2019, 367: 55-63.
- [11] Zhou T Y, Ding L, Che G B, *et al.* Recent advances and trends of molecularly imprinted polymers for specific recognition in aqueous matrix: Preparation and application in sample pretreatment[J]. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2019, 114: 11-28.
- [12] Li X J, Zhang B L, Tian L, *et al.* Effect of carboxyl density at the core-shell interface of surface-imprinted magnetic trilayer microspheres on recognition properties of proteins[J]. Sens Actuators B: Chem, 2014, 196: 265-271.
- [13] Qian L W, Hu X L, Guan P, *et al.* The effectively specific recognition of bovine serum albumin imprinted silica nanoparticles by utilizing a macromolecularly functional monomer to stabilize and imprint template[J]. Analytica Chimica Acta, 2015, 884: 97-105.
- [14] 钱立伟,李季,宋文琦,等.采用大分子单体稳定印迹牛血清白蛋白[J].高等学校化学学报,2016,37(11):2092-2100.
- [15] Liu Y, Chen M M, Song L. Comparing the effects of Fe(III) and Cu(II) on the binding affinity of erlotinib to bovine serum albumin using spectroscopic methods[J]. Journal of Luminescence, 2013, 134: 515-523.
- [16] Chen H C, Kong J, Yuan D Y, *et al.* Synthesis of surface molecularly imprinted nanoparticles for recognition of lysozyme using a metal coordination monomer[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2014, 53: 5-11.
- [17] EL-Sharif H F, Yapati H, Kalluru S, *et al.* Highly selective BSA imprinted polyacrylamide hydrogels facilitated by a metal-coding MIP approach[J]. Acta Biomaterialia, 2015, 28: 121-127.
- [18] Ran D, Wang Y Z, Jia X P, *et al.* Bovine serum albumin recognition via thermosensitive molecular imprinted macroporous hydrogels prepared at two different temperatures[J]. Anal Chim Acta, 2012, 723: 45-53.
- [19] Dong X Z, Ma Y, Hou C P, *et al.* Preparation of pH and temperature dual-sensitive molecularly imprinted polymers based on chitosan and N-isopropylacrylamide for recognition of bovine serum albumin[J]. Polymer International, 2019, 68(5): 955-963.
- [20] Tsai H Y, Lee A, Peng W, *et al.* Synthesis of poly(N-isopropylacrylamide) particles for metal affinity binding of peptides[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2014, 114: 104-110.
- [21] Li D Y, Zhang X M, Yan Y J, *et al.* Thermo-sensitive imprinted polymer embedded carbon dots using epitope approach[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2016, 79: 187-192.
- [22] Stöber W, Fink A, Bohn E. Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range[J]. J Colloid Interface Sci, 1968, 26: 62-69.
- [23] Li X J, Zhou J J, Tian L, *et al.* Effect of crosslinking degree and thickness of thermosensitive imprinted layers on recognition and elution efficiency of protein imprinted magnetic microspheres[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2016, 225: 436-445.
- [24] Wang S Y, Chen K M, Li L, *et al.* Binding between proteins and cationic spherical polyelectrolyte brushes: Effect of pH, ionic strength, and stoichiometry[J]. Biomacromolecules, 2013, 14: 818-827. ■