

分子印迹免疫分析技术及其 应用研究进展

徐志祥^{1,2}, 方国臻¹, 张燕¹, 王硕¹

(1. 天津科技大学食品营养与安全省部共建教育部重点实验室, 天津 300457;

2. 山东农业大学食品学院, 山东泰安 271018)

摘要: 详细介绍了分子印迹聚合物的形成机理及其应用, 分子印迹免疫吸附检测技术的原理, 评述了国内外分子印迹放射免疫、荧光免疫和酶联免疫吸附检测技术在药品、农药等痕量残留分析检测中的应用研究, 重点对分子印迹免疫检测技术研究的难点、存在的问题和发展前景进行了分析, 认为酶标记分子印迹免疫分析技术是发展的方向。

关键词: 分子印迹; 免疫吸附检测; 酶联免疫

中图分类号: O652.7

文献标识码: A

文章编号: 0253-4320(2008)04-0032-04

Advances in molecularly imprinted sorbent immunoassay and its application

XU Zhi-xiang^{1,2}, FANG Guo-zhen¹, ZHANG Yan¹, WANG Shuo¹

(1. Key Laboratory of Food Nutrition and Safety of Ministry of Education of China, Faculty of Food Engineering and

Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China; 2. College of Food Science and Engineering, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China)

Abstract: The formation mechanism of molecularly imprinted polymer (MIPs) and its application, the principle of molecularly imprinted sorbent immunoassay are introduced in detail and reviewed in this paper. The application of radio-labeled molecularly imprinted sorbent immunoassays, fluorescence labeled molecularly imprinted sorbent immunoassays and enzyme-linked molecularly imprinted sorbent immunoassays in the determination of medicine and pesticide are presented. The advantages, disadvantages, technologically problems and the prospect of molecularly imprinted sorbent immunoassay are described with emphasis.

Key words: molecular imprinting; molecularly imprinted sorbent immunoassay; enzyme-linked immunoassay

自1959年 Yallow 与 Berson 首次提出了放射性标记免疫分析方法以来, 相继发展了酶联免疫、化学发光免疫、荧光免疫等多种非放射性标记免疫分析方法。免疫分析方法具有特异性强以及常规理化分析技术无可比拟的选择性和较高的灵敏度, 非常适合于复杂基质中痕量组分的分析, 已成为生物化学、临床化学与环境检测等领域中应用最为广泛的快速检测方法之一。但传统生物抗体产生过程的复杂性及其固有的理化性质限制了它的广泛应用: 其一, 尽管单克隆和基因重组技术的出现使人们能够方便地获取大量高纯度生物抗体, 但研制或制备过程相当繁琐, 周期长, 并存在诸多难以预测的生物因素; 其二, 理化性质不稳定, 对一些分析条件如酸/碱、有机溶剂、温度等耐受性差。因此人们一直积极探索改进的方法, 提高生物抗体的稳定性, 降低生产成本。

合成性能稳定的人工模拟抗体成为免疫分析研究的热点。

1 分子印迹技术

分子印迹技术是20世纪90年代兴起的一项新型功能材料制备技术, 是当前国际研究的热点之一。分子印迹技术是仿照抗体的形成机理, 在模板分子周围形成一个高度交联的刚性高分子, 除去模板分子后在聚合物的网络结构中留下了与模板分子大小和形状相匹配的立体孔穴, 这种具有“记忆”功能的分子印迹聚合物可以选择性地吸附模板分子, 成为建立各种选择性分离或检测方法的基础^[1]。

由于其卓越的分子识别性能和在手性物质分离、环境分析和催化科学中潜在的应用价值引起了广泛关注, 迅速成为一个热门研究课题^[2-3]。目前,

收稿日期: 2007-12-03

基金项目: 国家自然科学基金(30571532)和山东省自然科学基金(Q2006B04)资助项目

作者简介: 徐志祥(1973-), 男, 博士生, 讲师, 研究方向为食品安全, zhixiangxu@sina.com; 王硕(1969-), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向为食品安全, 通讯联系人。

分子印迹聚合物最主要的应用之一是分子印迹色谱技术。分子印迹聚合物作为分析或制备分离色谱的固定相,用于建立固相萃取(SPE)、高效液相色谱(HPLC)或毛细管电泳(CE)分析^[4-9];作为生物传感器的识别元件制作生物传感器,是分子印迹聚合物的另一重要应用^[10-11]。分子印迹聚合物还可应用于药物的手性拆分等领域^[12],特别是将印迹聚合物作为“人工抗体”,代替生物抗体建立类似于免疫分析的分子印迹免疫吸附检测技术(molecularly imprinted sorbent immunoassays),已成为分子印迹技术领域新的发展方向,引起了人们的极大关注^[13-15]。

2 分子印迹免疫吸附检测技术原理

由于印迹聚合物表现出的良好物理、化学性能以及接近或达到天然抗体对抗原的高度亲和性和专一性,因此将印迹聚合物替代生物抗体用于小分子物质的免疫分析是完全可能的^[16]。已有的研究表明,模板分子与分子印迹聚合物之间不仅在理论上存在类似于抗原与抗体的反应行为,而且大量的研究实践证明了分子印迹聚合物取代生物抗体的可行性^[17-29]。将免疫分析理论和方法移植于模板分子与分子印迹聚合物的特异性识别反应,建立以模板分子与印迹聚合物特异性识别反应为基础分子印迹免疫吸附检测技术,将具有较大的发展和应用空间。图1是2,4-D分子印迹酶联免疫化学发光检测法示意图^[20]。

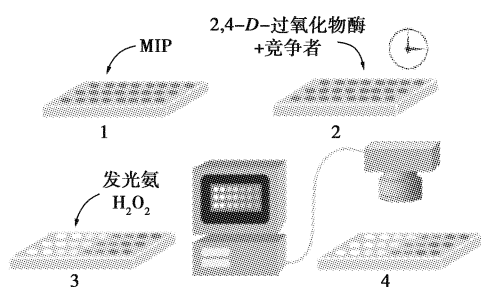


图1 分子印迹酶联免疫化学发光检测法示意图

3 分子印迹免疫吸附检测技术应用

分子印迹免疫吸附检测技术在国外有少量的相关研究报道,已被用于药物、杀虫剂、皮质类固醇、激素等的检测。Andrsson及其合作者还将其直接用于稀释血浆中的检测,而我国在这方面的研究基本上未见报道。

3.1 分子印迹放射免疫吸附检测(RMIAs)

1993年, Mosbach研究小组首先将分子印迹聚

合物用于配体结合免疫分析,他们以茶碱和地西洋为模板分子制备了分子印迹聚合物,然后用于类似免疫分析的放射性配体结合分析,研究了放射免疫分析中用分子印迹聚合物代替生物抗体的可行性,并对分子印迹聚合物与生物抗体在亲和力、识别特异性和检测灵敏度等方面的差异进行了比较。结果表明,所建立的配体结合分析方法可与传统的免疫分析相媲美。后来他们又将该方法用于农药莠去津^[21]和环孢素A^[22]的测定,在甲苯中分子印迹聚合物结合莠去津的解离常数低至 10^{-6} mol/L,对莠去津的选择性结合可与生物抗体相比。后来该方法被 Catt等用于竞争性放射免疫测定人体内的激素。Ye等以茶碱和17- β -雌二醇为模板分子,采用沉淀聚合法制备了微米级的单分散微球,将其用于放射性免疫分析,聚合物显示了与生物抗体类似的高选择性,在竞争吸附测定中发现,茶碱印迹聚合物对于比茶碱少1个甲基的甲基黄嘌呤只有7%的吸附(相对于茶碱),对于多1个甲基的咖啡碱则基本上没吸附,而且这种聚合物具有与单克隆抗体大致相同的交叉反应,用茶碱印迹聚合物测定病人血清中的茶碱含量,所得结果同常规的酶联免疫分析结果一致。

Idziak等^[23]在甲苯中以4-乙炔基吡啶和甲基丙烯酸复合物为功能单体制备了17- α -乙炔雌醇的分子印迹聚合物,将其用于放射免疫分析,其识别17- α -乙炔雌醇及其类似物的性质与生物抗体相似。Andrsson等在1993年建立了安定的人工抗体放射免疫检测技术,分子印迹聚合物的亲和性不如生物抗体($K_d < 10^{-8}$ mol/L),但选择性较高,稳定性强。目前还建立了吗啡^[24]和萘心安^[25]等的分子印迹放射免疫分析方法。

3.2 分子印迹荧光免疫吸附检测(FMIAs)

Piletsky等于1997年首先探索了荧光标记物在分子印迹免疫吸附检测中的应用。他们以甲基丙烯酸和甲基丙烯酸二乙胺乙酯为功能单体、乙二醇二甲基丙烯酸酯或二乙烯基苯为交联剂,合成了氯霉素分子印迹聚合物并用于生物传感器,取得了良好效果。2001年他们对肾上腺素、莠去津荧光标记分子印迹吸附检测技术进行了研究,检测波长为512 nm^[26]。我国朱庆枝等^[27]也利用分子印迹技术制备了卵清蛋白(EA)的人工抗体,采用类似天然抗体的竞争型免疫分析,建立了卵清蛋白的仿生荧光免疫分析方法,其他相关研究国内未见报道。

3.3 分子印迹酶联免疫吸附检测(EMIIAs)

酶联免疫检测技术自20世纪70年代问世以

来,就因高度的准确性、特异性、适用范围广、检测速度快,成为一种最为广泛和发展最为成熟的生物检测与分析技术。从标记方法来看,酶标记方法不仅使用方便、检测效果好,而且是最具有应用价值的标记方法。特别是近几年随着分子印迹技术的发展以及悬浮聚合、沉淀聚合等新的合成方法的应用,使得分子印迹在水中进行成为可能;表面分子印迹技术的发展,使得聚合物的结合位点分布在聚合物的表面,酶标更容易结合^[28],从而极大地促进了分子印迹酶联免疫吸附检测技术的发展。

Surugiu 等^[20]首先使用烟草过氧化物酶(TOP)作为标记物建立了 2,4-二氯苯氧基乙酸(2,4-D,除草剂)的分子印迹酶联免疫吸附检测方法。他们将 2,4-D 作为模板采用沉淀聚合法合成了分子聚合物微球(SMIPs),该聚合物微球可在水溶液中进行吸附。采用过碘酸盐氧化法将烟草过氧化物酶与抗原相连,将该聚合物微球用作酶标探针跟踪水溶液中的烟草过氧化物酶比色光的变化情况,但该探针的灵敏度低于生物抗体探针。用比色和化学发光法分别进行免疫测定,二者对应的分析质量浓度范围分别为 40 ~ 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 1 ~ 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

Sergey 等^[26]使用辣根过氧化物酶(HRP)作为标记物对肾上腺素、莠去津和蛋白质的分子印迹吸附检测技术进行了研究。他们采用一种新的分子印迹聚合方法,在 3-氨基苯硼酸(APBA)、3-噻吩硼酸(TBA)和苯胺等功能单体存在下,于水中制得了肾上腺素、莠去津甚至蛋白质的分子印迹聚合物,然后将其嫁接到聚苯乙烯微板的表面,从而形成了专门适合于低分子质量物质印迹吸附检测的微量滴定板。结果表明,这种微量滴定板具有与生物抗体类似的结合特性,稳定性和重复性好,特别适合于酶联免疫分析,有望成为传统生物抗体的替代产品。

Kempe 等^[29]使用 HRP 作为标记物对阿拉特津、苯基厄福伦盐酸盐的分子印迹吸附测定进行了研究,获得了良好的研究结果。但使用酶标记的分子印迹吸附测定法测定阿拉特津时,亲和力比生物抗体略差些。Haupt 等^[17]研究了 2,4-D 印迹聚合物对模板分子及其 7 种类似物的吸附作用,采用放射标记、化学发光和酶联免疫 3 种方法检测。结果表明,印迹聚合物对模板分子具有较高的选择性吸附,对其他类似物的吸附容量较小,但对 2,4-二氯苯氧乙酸和 4-氯苯氧乙酸也具有相对较高的吸附。

4 存在问题与发展前景

分子印迹免疫吸附检测应用中需要解决以下 3

个关键问题:①残留分析中痕量的分析物和复杂的基质对印迹聚合物的亲和性和选择性有很高的要求,而目前印迹聚合物对模板分子的亲和性明显低于天然抗体或受体,检测的灵敏度不高,这是限制印迹聚合物作为“人工抗体”在免疫检测中应用的关键因素之一。②分子印迹聚合物骨架的非特异性吸附使得分子印迹酶联免疫吸附检测分析中交叉反应很大。③标记物的选择和标记方式。比较而言,酶标记的应用前景要广阔得多。然而由于酶标记分子印迹吸附检测的反应过程涉及到化学和生化反应 2 个体系的协同问题,同时印迹聚合物具有的疏水性和高度交联的刚性结构限制了大分子物质(如酶)接近聚合物的结合位点。分子印迹聚合物大多只能在有机相中进行聚合和应用,而天然的分子识别系统大多是在水溶液中进行的,如何能在水溶液和极性溶液中进行分子印迹和识别也是一大难题。因此将分子印迹聚合物应用于免疫检测技术的研究存在许多技术性挑战,世界各国都将酶标记分子印迹吸附检测技术研究作为分子印迹技术应用领域的热点和难点。

分子印迹免疫吸附检测技术是近几年才发展起来的新型分析方法,在痕量物质分析特别是酶联免疫分析方面还处于起步阶段,从理论到方法都缺乏系统、深入的研究。但分子印迹吸附检测技术在环境、食品、分析化学领域有着广阔的应用前景,特别是随着分子印迹技术的不断发展和完善,将在痕量物质的快速检测方面发挥重要作用。

参考文献

- [1] Cormack P, Mosbach K. Molecular imprinting: Recent developments and the road ahead[J]. *React Funct Polym*, 1999, 41: 115 - 124.
- [2] Matthew P D, Vern D B, David P. Approaches to the rational design of molecularly imprinted polymers[J]. *Anal Chim Acta*, 2004, 504: 7 - 14.
- [3] Burow M, Minoura N J, Biochem B. Molecular imprinting: Synthesis of polymer particles with antibody-like binding characteristics for glucose oxidase[J]. *Res Commun*, 1996, 227: 419 - 422.
- [4] Christina S, Hans M. Synthesis of a molecularly imprinted polymer for the selective solid-phase extraction of chloramphenicol from honey[J]. *J Chromatogr A*, 2006, 1132: 325 - 328.
- [5] Raquel G C S, Fabio A. Sol-gel molecular imprinted ormosil for solid-phase extraction of methylxanthines[J]. *J Chromatogr A*, 2006, 1114: 216 - 223.
- [6] Martín-Esteban A. Molecularly imprinted polymers: new molecular recognition materials for selective solid-phase extraction of organic compounds[J]. *Fresenius J Anal Chem*, 2001, 370: 795 - 802.
- [7] Lin Q L, Zhang J, Fu Q, et al. Concentration and extraction of sinome-

- nine from herb and plasma using a molecularly imprinted polymer as the stationary phase[J]. *Anal Chim Acta*, 2006, 561:178 - 182.
- [8] Breton F, Euzet P, Piletsky S A, *et al.* Integration of photosynthetic biosensor with molecularly imprinted polymer-based solid phase extraction cartridge[J]. *Anal Chim Acta*, 2006, 569:50 - 57.
- [9] Andersson L I. Molecular imprinting for drug bioanalysis: A review on the application of imprinted polymers to solid-phase extraction and binding assay[J]. *J Chromatogr B*, 2000, 739:163 - 173.
- [10] Whitcombe M J, Rodriguez M E, Villar P, *et al.* A new method for the introduction of recognition site functionality into polymers prepared by molecular imprinting, synthesis and characterization of polymeric receptors for cholesterol[J]. *J Am Chem Soc*, 1995, 117:7105 - 7111.
- [11] Leung M K-P, Chow C-F, Lam M H-W. A sol-gel derived molecular imprinted luminescent PET sensing material for 2,4-dichlorophenoxyacetic acid[J]. *J Mater Chem*, 2001, 11:2985 - 2991.
- [12] Lin J M, Nakagama T, Uchiyama K, *et al.* Molecularly imprinted polymer as chiral selector for enantioseparation of amino acids by capillary gel electrophoresis[J]. *Chromatographia*, 1996, 43(11/12):585.
- [13] Sellergren B. Noncovalent molecular imprinting: Antibody-like molecular recognition in polymeric network materials[J]. *Trends Anal Chem*, 1997, 16:310 - 320.
- [14] Haupt K, Mosbach K. Plastic antibodies: Developments and applications[J]. *Trends Biotechnol*, 1998, 16:468 - 475.
- [15] Vlatakis G, Andersson L I, Muller R, *et al.* Drug assay using antibody mimics made by molecular imprinting[J]. *Nature*, 1993, 361:645.
- [16] Borrebaeck C A K. Antibodies in diagnostics—from immunoassays to protein chips[J]. *Immunology Today*, 2000, 21:379 - 382.
- [17] Haupt K, Mayes A G, Mosbach K. Herbicide assay using an imprinted polymer based on system analogous to competitive fluorimmunoassay[J]. *Anal Chem*, 1998, 70:3936.
- [18] Sellergren B, Lepisto M, Mosbach K. Highly enantioselective and substrate-selective polymers obtained by molecular imprinting utilizing non-covalent interaction NMR and chromatography studies on the nature of recognition[J]. *J Am Chem Soc*, 1988, 110:5853 - 5860.
- [19] Muldoon M T, Stanker L H. Polymer synthesis and characterization of a molecularly imprinted sorbents assay for atrazine[J]. *J Agric Food Chem*, 1995, 43:1424 - 1427.
- [20] Surugi I, Ye L, Ecevit Y. An enzyme-linked molecularly imprinted sorbent assay[J]. *J Analyst*, 2000, 125:13.
- [21] Siemann M, Andersson L, Mosbach K. Selective recognition of the herbicide atrazine by noncovalent molecularly imprinted polymers[J]. *J Agric Food Chem*, 1996, 44:141 - 145.
- [22] Wulff G. Molecular imprinting in cross-linked materials with the aid of molecular templates—away towards artificial antibodies[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 1995, 34:1812.
- [23] Idziak I, Benrebouh A. A molecularly imprinted polymer for 17 α -ethynylestradiol evaluated by immunoassay[J]. *J Analyst*, 2000, 125:1415.
- [24] Andersson L I, Muller R, Vlatakis G. Mimics of the binding sites of opioid receptors obtained by molecular imprinting of enkephalin and morphine[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1995, 92:4788 - 4792.
- [25] Andersson L. Application of molecular imprinting to the development of aqueous buffer and organic solvent based radioligand binding assay for (s)-propranolol[J]. *Anal Chem*, 1996, 68:111 - 117.
- [26] Sergey A P, Elena V. Substitution of antibody and receptors with molecularly imprinted polymers in enzyme-linked and fluorescent assay[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2001, 16:701.
- [27] 朱庆枝, 李顺华, 许金钩. 仿生荧光免疫分析卵清白蛋白[J]. 福州大学学报:自然科学版, 1999(27):113 - 115.
- [28] Fang G Z, Tan J, Yan X P. Synthesis and evaluation of an ion-imprinted functionalized sorbent for selective separation of cadmium ion[J]. *Sep Sci Technol*, 2005, 40:1597 - 1608.
- [29] Kempe M, Mosbach K. Molecular imprinting used for chiral separation[J]. *J Chromatogr*, 1995, 694:3 - 13. ■

空气产品公司推出新产品

全球领先的气体 and 特种气体供应商——空气产品公司日前在北京展览馆举办的第六届中国国际科学仪器及实验室装备展览会上发布和展出了 Experis™ 特种气体系列产品。美国空气产品公司是全球性的气体、加工和特种气体、功能材料、设备和服务供应商, 该公司服务于全球工业、能源、技术和保健市场, 以创新文化和卓越运营而闻名, 多年来空气产品公司在履行公司责任承诺方面一贯注重社会责任, 在服务社区、为社会捐款、节能减排、对环境安全的承诺等方面都有较高的要求。空气产品公司服务于全球的四大业务是商用气体、能源市场、电子和功能材料、医疗保健。空气产品公司一直专注于在中国市场的发展, 并致力于不断开发创新的技术和产品, 为中国客户提供业内优质的产品和服务。

该次展会上推出的 Experis™ 系列气体是专门为全世界的实验室研究人员设计, 可帮助他们满足众多行业对测试结果精确性的苛刻标准的要求。Experis™ 气体的关键应用包括对污水和废气排放的测试, 以遵从国家和国际环保标准。

Experis™ 系列气体提供了气体纯度的最高水平, 混合气体的稳定性让分析化学家可安心使用。Experis™ 系列气体包括: 广泛的超高纯度气体(UHP)系列; 最精确的校准混合气体。它的主要特点是纯度、精确、稳定、放心。

为了更好地完善和补充 Experis™ 系列气体, 空气产品公司也提供了高质量的气体控制设备, 包括钢瓶校准分析仪、集合真空管、净化系统和压力计, 并提供设备设计, 为满足客户需要建立和安装定制服务。

Experis™ 系列气体可广泛地应用在众多行业中, 包括汽车、电子、环境测试、医疗、天然气和化工制造等行业。随着行业要遵守越来越严格的环境法规, 工艺控制的要求也越来越苛刻, 要求对化工化合物的精确分析至关重要, 因此对分析化学家在这方面的要求也愈加严格。

在空气产品公司的展台还同时展出了具有专利技术的先进钢瓶处理技术和先进的充填技术, 采用该技术可以使瓶内的气体有较长的保质期, 可放心使用, 目前已被众多欧洲国家实验室使用, 采用该技术可使校准混合气有高稳定性和较长保质期。

空气产品公司亚洲瓶装气体业务经理 Craig Hunt 先生表示: “空气产品公司在特种气体业务上有超过 40 年的经验。继在全世界成功地发布了 Experis™ 系列气体后, 尤其是最近在东南亚和欧洲中部市场的成功发布, 我们现在非常荣幸能把这些卓越的产品介绍给中国客户。我们理解精确分析结果的至关重要性, 并相信 Experis™ 系列气体为分析行业气体设立了标准”。(章照)