

分子印迹聚合物薄膜用于蛋白质的 MALDI-TOF MS 检测

曾周芳¹, 肖春生², 国新华¹

(1. 吉林大学化学学院, 吉林 长春 130012; 2. 中国科学院长春应用化学研究所, 吉林 长春 130022)

Molecularly Imprinted Polymer Thin Films for Enrichment of Protein and Direct MALDI-TOF MS Analysis

ZENG Zhou-fang¹, XIAO Chun-sheng², GUO Xin-hua¹

(1. College of Chemistry, Jilin University, Changchun 130012, China;

2. Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130022, China)

Abstract: The lysozyme-imprinted polymer thin films were prepared by micro-contact printing technique. These thin films showed special binding to lysozyme and were able to be analyzed by MALDI-TOF MS directly. Therefore, this method may open a new avenue for efficient, convenient and fast determination of proteins.

Key words: MALDI-TOF MS; MIP thin films; proteins assay; lysozyme

中图分类号: O 657.63

文献标识码: A

文章编号: 1004-2997 (2009) 增刊-0031-02

MALDI-TOF MS (Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry) 是一种有效的软电离质谱方法^[1], 具有很高的灵敏度, 适用于生物样品如蛋白质的分析检测。然而, 实际蛋白质样品的 MALDI-TOF MS 分析存在样品相对浓度过低以及易受其他生物大分子干扰等困难。因此, 急需发展一种简单、有效、通用的分离和富集蛋白质的方法, 使之能够在 MALDI-TOF MS 谱图上检出目标蛋白。

目前, 分子印迹聚合物 (MIP) 已被广泛地应用于分离^[2]、生物传感器^[3]、催化剂^[4]等领域, 它是通过模板分子在聚合物基质上制造人工识别位点的有效方法。利用蛋白质分子作为模板, 可以制得能够特异识别目标蛋白的 MIP。所制得的 MIP 具有和天然蛋白相比拟的结合能力, 而且具有廉价、易制、易保存和可重复使用等优点。本工作综合了上述两种方法的优势, 首先提出利用分子印迹薄膜特异性吸附并富集目标蛋白, 再用 MALDI-TOF MS 对其进行分析, 旨在建立一种高效、简便、经济的蛋白质快速检测方法。

1 实验部分

1.1 主要仪器

MALDI-TOF MS AXIMA-CFR: 日本岛津公司产品, 激光波长 337 nm, 加速电压+20 kV, 正离子线性模式。

1.2 主要试剂

溶菌酶 (lysozyme), 介子酸 (SA): sigma 公司产品; 丙烯酸 (Aac): 北京益利精细化学品有限公司产品; 过硫酸铵 (APS): 北京化工厂产品; *N,N'*-亚甲基双丙烯酰胺 (MBAA): 天津市永大化学试剂开发中心产品; *N,N,N',N'*-四甲基乙二胺 (TEMED): 国药集团化学试剂有限公司产品。

1.3 实验方法

MIP薄膜的制备: AAc, APS, MBAA, TEMED混合, 依据微接触印记^[5]的方法制得MIP薄膜;

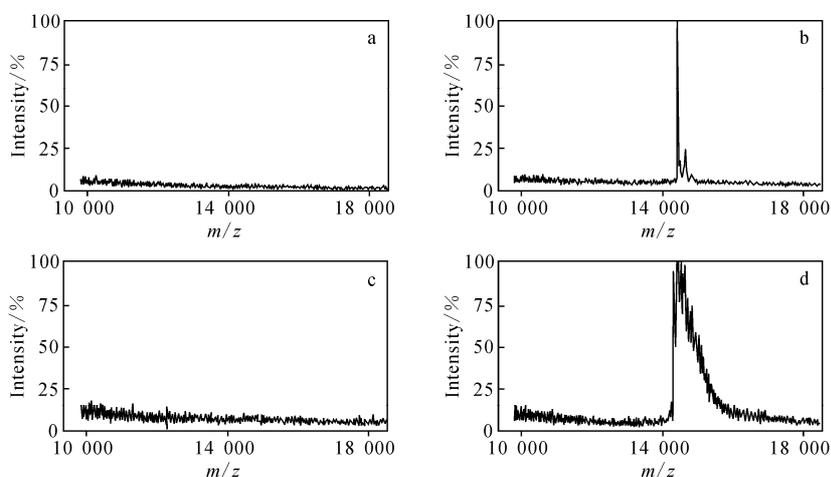
作者简介: 曾周芳 (1988~), 女 (汉族), 福建福州人, 研究生。E-mail: jluzzf@163.com

通信作者: 国新华 (1962~), 女 (汉族), 吉林长春人, 副教授, 从事生物样品分离和质谱分析研究。E-mail: guoxh@jlu.edu.cn

基质溶液配制：将基质芥子酸用V(3%三氟乙酸水溶液):V(乙腈)=2:1的混合溶剂溶解，配成浓度为 $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的溶液；样品分析：取出 $10\text{ }\mu\text{L}$ 基质溶液，滴在制备好的聚合物薄膜上，在空气中室温下凉干，将制备有薄膜的玻璃片贴在不锈钢板上，放入离子源中待测。

2 结果与讨论

采用MALDI-TOF MS测定聚合物薄膜上的溶菌酶，结果示于图1。可以看出，没有印记溶菌酶的薄膜上溶菌酶的峰未被观察到(图1a)，而溶菌酶印记的薄膜上，MALDI-TOF MS能够检测出溶菌酶的峰(图1b)，说明溶菌酶已被成功印记到薄膜上。经过洗脱，薄膜上印迹的溶菌酶分子被完全洗脱(图1c)，留下能特异性识别溶菌酶的结合位点。再经过重新吸附溶菌酶后，MALDI-TOF MS谱图上又可见溶菌酶的峰(图1d)，说明该印迹薄膜能够吸附溶菌酶，并被MALDI-TOF MS检测。因此，该溶菌酶印记的聚合物薄膜对溶菌酶有具有特异性吸附，并可实现对蛋白质分子的富集和直接用于MALDI-TOF MS分析。



注：*代表的是溶菌酶的峰

图1 溶菌酶($0.05\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)的MALDI-TOF MS谱图

(a) 非印记薄膜；(b) 分子印迹薄膜；(c) 洗脱后的分子印迹薄膜；(d) 洗脱后重新吸附溶菌酶分子印迹薄膜

Fig.1 MALDI-TOF MS spectra of lysozyme ($0.05\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) obtained with non-printed film(a), printed film(b), washed printed film(c), the printed film after washing and resorption of lysozyme(d)

3 小结

MIP能够用于蛋白质样品的特异性识别及富集，并利用MALDI-TOF MS直接进行样品的分析，这样不仅大大简化了生物样品的前处理过程，提高了检测效率，而且MIP具有可重复使用、廉价和易制等特点，有望成为一种经济、简便的蛋白质检测新方法。

参考文献:

- [1] CHENA L C, MORI K, HOR H, et al. Au-assisted visible laser MALDI[J]. *J Mass Spectrom*, 2009, 279(1): 41-46.
- [2] WU G H, WANG Z Q, WANG J, et al. Hierarchically imprinted organic-inorganic hybrid sorbent for selective separation of mercury ion from aqueous solution[J]. *Anal Chim Acta*, 2007, 582: 304-310.
- [3] LI X, HUSSON S M. Adsorption of dansylated amino acids on molecularly imprinted surfaces: a surface plasmon resonance study[J]. *Langmuir*, 2006, 22(3): 9 658-9 663.
- [4] PASETTO P, MADDOCK S C, RESMINI M. Synthesis and characterisation of molecularly imprinted catalytic microgels for carbonate hydrolysis[J]. *Anal Chim Acta*, 2005, 542(1): 66-75.
- [5] LIN H Y, HSU C Y, THOMAS J L, et al. The microcontact imprinting of proteins: The effect of cross-linking monomers for lysozyme, ribonuclease A and myoglobin[J]. *Biosens and Bioelectron*, 2006, 22(4): 534-543.