http://pmse.scu.edu.cn

蛋白质印迹羧化多壁碳纳米管/CaAlg水凝胶膜及其修饰的电化学传感器

高欣悦，郭智龙，董 鹏，谢慧珂，张世潮，江坚盛，赵孔银，侯彦辉
(天津工业大学 材料科学与工程学院，天津 300387)

摘要: 文中以牛血清白蛋白(BSA)为模板、海藻酸钠(NaAlg)为功能单体，掺杂羧化多壁碳纳米管，经$CaCl_2$溶液交联制备了BSA分子印迹羧化多壁碳纳米管/海藻酸钙(CMWCNTs/CaAlg)复合水凝胶膜(MIP)，同时不用模板制备了非印迹膜(NIP)，研究了CMWCNTs含量对膜力学性能的影响；膜厚度、洗脱液pH值对BSA吸附性能的影响。研究了MIP膜的吸附选择性。结果表明，当CMWCNTs的质量为NaAlg的2%时，水凝胶膜同时具备良好的抗溶胀性能和力学性能。膜厚度控制在0.2 mm，洗脱液pH值为7.4时，MIP膜对BSA的吸附量最大，为35.04 mg/g。将MIP膜负载于裸碳电极表面，循环伏安法和差分脉冲伏安法测试表明，MIP膜修饰电极对BSA表现出较高的选择识别性。

关键词: 蛋白质分子印迹；海藻酸钙水凝胶；羧化多壁碳纳米管；电化学传感器
中图分类号：TP212 **文献标识码**：A **文章编号**：1000-7555(2023)12-0111-07

分子印迹聚合物(MIP)是一种根据目标分子尺寸大小、空间结构、形状及结合位点设计的高分子材料，具有对目标分子的特异识别性、高亲和性等优点。MIP已广泛应用于生物传感[1]、应用催化[2]、固相萃取[3]、药物传递[4]、分离[5]等领域。作为一个重要的领域，负载MIP的传感器在环境检测[6]、医学诊断[7]、电化学平台[8]等方面受到极大的关注。目前对分子印迹的研究主要集中在小分子的模板上，而面对生物蛋白印迹仍然存在巨大的挑战[9,10]，其主要原因在于传统小分子单体会破坏蛋白质结构，导致印迹孔穴的识别性降低[11,12]。

针对这一问题，近年来，研究人员选择大分子单体作为功能单体来制备MIP。钱立伟等利用1-乙烯基-3-氨基甲酰甲基咪唑氯化物离子液体为共单体和稳定剂，制备了BSA印迹N-异丙基丙烯酰胺水凝胶[13]。该课题组还合成了一种两性离子高分子聚合物(1-乙烯基-3-磺丙基咪唑)，用于制备溶菌酶MIP[14]。赵伟等通过聚苯胺与两亲性共聚物的大分子组装，构建了蛋白质电化学传感器，制备出高性能蛋白质分子印迹传感器[15]。但是，该大分子单体制备过程复杂，周期性长，并且需使用紫外光交联，这会大大影响蛋白质模板的活性。

水凝胶是一种三维网状结构的亲水性聚合物，具有良好的生物相容性[16]。蛋白质分子印迹水凝胶具有刺激响应性，能通过调节水凝胶与蛋白质之间的相互作用来实现对蛋白质的精准快速识别及释放，因此水凝胶有望成为蛋白质分子印迹的通用材料[17]。本课题组以海藻酸钠水凝胶为功能单体制备了厚度可控的蛋白质印迹海藻酸钙膜[18]。然而，单独的海藻酸钙水凝胶力学性能差、易溶胀，导致印迹孔穴结构易被破坏，严重降低印迹识别能力。Wang等在玻碳电极上构建了基于热响应记忆水凝胶的牛血清白蛋白(BSA)印迹电化学传感器，该传感器具有选择识别性高、稳定性好等优点，但是这种温敏水凝胶是非导电的，限制了其实际应用[19]。本文以海藻酸钠(NaAlg)为功能单体，掺杂羧化多壁碳纳米管(CMWCNTs)，以BSA为模板分子，$CaCl_2$溶液交联制备了BSA分子印迹水凝胶膜，并以此为识

doi:10.16865/j.cnki.1000-7555.2023.0240
收稿时间：2023-01-04
基金项目：大学生创新创业训练计划(202010058089，202010058065)
通讯联系人：赵孔银，主要从事膜分离研究，E-mail：zhaokongyin@tjpu.edu.cn

别元件负载于电化学传感器上，用于对模板分子的选择性识别。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

NaAlg、KH550硅烷：分析纯，上海阿拉丁生化科技有限公司产品；CMWCNTs：分析纯，南京先丰纳米材料科技有限公司产品；氯化钙($CaCl_2$)：分析纯，国药集团化学试剂有限公司产品；氯化钠(NaCl)：化学纯，天津市化学试剂二厂产品；盐酸(HCl)：化学纯，天津兴化化学试剂厂产品；三(羟甲基)氨基甲烷(Tris)：分析纯，中国医学科学院生物医学工程研究所产品；牛血清蛋白(BSA)、卵清蛋白(OVA)、牛血红蛋白(BHb)、溶菌酶(Lys)：均为色谱级，上海兰吉科技发展公司产品；氯化钾(KCl)、铁氰化钾($K_3Fe(CN)_6$)、亚铁氰化钾($K_4Fe(CN)_6\cdot 3H_2O$)：化学纯，天津丰川化学试剂厂产品。

单纤维拉力试验仪：LLY-06F型，莱州电子仪器有限公司产品；傅里叶变换红外光谱仪(ATR-FTIR)：Nicolet iS50型，美国Thermo Fisher公司产品；紫外分光光度计：TU-1901型，北京普析通用仪器有限公司产品。

1.2 MIP水凝胶膜的制备

向5个烧杯中加入CMWCNTs(质量分别为NaAlg的0%，0.5%，1%，2%和3%)和20 mL去离子水。超声2 h以保证CMWCNTs分散均匀。向烧杯中加入0.0266 g BSA和0.5128 g NaAlg，搅拌至均匀，将铸膜液放入冰箱静置脱泡。之后用缠绕直径为0.2 mm，0.3 mm，0.4 mm和0.5 mm铜丝的玻璃棒在玻璃板上刮膜，然后将膜放入质量分数2.5% $CaCl_2$溶液中交联，用Tris-HCl洗脱液去除BSA模板分子得到不同CMWCNTs含量的MIP水凝胶膜。在相同条件下不加入BSA制备得到非印迹水凝胶膜(NIP)。

1.3 MIP水凝胶膜修饰电化学传感器的制备

首先将裸碳电极用无水乙醇溶液浸泡1 h，去除表面杂质，然后在KH550-CH_3CH_2OH混合溶液(体积比1:10)中浸泡12 h，在电极表面引入氨基活性基团，目的是提高电极表面的粘接强度。取少量铸膜液滴涂在改性电极上，然后加入质量分数2.5% $CaCl_2$溶液中交联2 h，最后用Tris-HCl洗脱液(pH=7.4)去除BSA模板分子得到MIP电化学传感器。NIP电化学传感器的制备方法与上述相同，只是不加入BSA。将制备好的传感器保存在质量分数2.5% $CaCl_2$溶液中以备测试。

1.4 测试与表征

1.4.1 MIP水凝胶膜结构表征：通过FT-IR对样品进行分析。扫描波长范围为400~4000 cm^{-1}，分辨率为±2 cm^{-1}。

1.4.2 MIP水凝胶膜修饰电化学传感器的形貌表征：通过冷场发射扫描电子显微镜(SEM，S-4800, 日本HITACHI)观察裸碳电极、MIP水凝胶膜修饰电极(CMWCNTs质量为NaAlg的2%)的表面形态。MIP水凝胶膜修饰电极经喷金处理，加速电压为20 kV。

1.4.3 MIP水凝胶膜溶胀性能测试：用致孔器将含有不同CMWCNTs含量的MIP膜刻成大小相同的膜片，用滤纸吸干膜表面的水后称量，然后将膜片分别浸入含10 mL质量分数0.9% NaCl溶液的小烧杯中，在一定间隔时间内取出膜片，用滤纸吸干膜片表面的水分，称量并记录测试数据。按照上述步骤重复称量，直至膜片质量达到平衡或胀破。溶胀率(R_s)的计算公式为

$$R_s=\frac{W_t-W_0}{W_0} \tag{1}$$

式中：W_0和W_t分别为初始质量和不同时间点的质量。

1.4.4 MIP水凝胶膜力学性能测试：首先将不同CMWCNTs含量的MIP水凝胶膜在湿态情况下分别裁剪成宽5 mm、长40 mm的样品。拉伸试验前，单丝拉力测定仪的实验参数设置为温度25 ℃、速度10 mm/min、断裂门限80%、初始隔距10 mm、线密度1 dTex。断裂伸长率计算方法为

$$\lambda=\frac{L-L_0}{L_0} \tag{2}$$

式中：L_0与L分别代表水凝胶膜初始拉伸长度(夹持器隔距)和拉伸断裂后的长度。

1.4.5 MIP水凝胶膜吸附性能测试：在洁净小瓶中放入10 mL洗脱液(pH=7.4的Tris-HCl缓冲液)。将切好的不同厚度的圆形膜片分别放入洁净小瓶中，洗脱12 h，然后取出膜片，用去离子水冲洗掉洗脱液后，将其放入含有10 mL浓度为20 μmol/mL BSA溶液的小瓶中，并从此刻开始计时。调节紫外分光光度计波长为280 nm，每间隔一段时间测试样品的吸光度，并做好相应记录

$$Q=\frac{C_0-C_t}{W}\times V \tag{3}$$

式中：Q——某一时间MIP膜与NIP膜对蛋白质的吸附量；C_0——蛋白质溶液的起始浓度，mg/mL；C_t——某一时间蛋白质溶液的浓度，mg/mL，V——

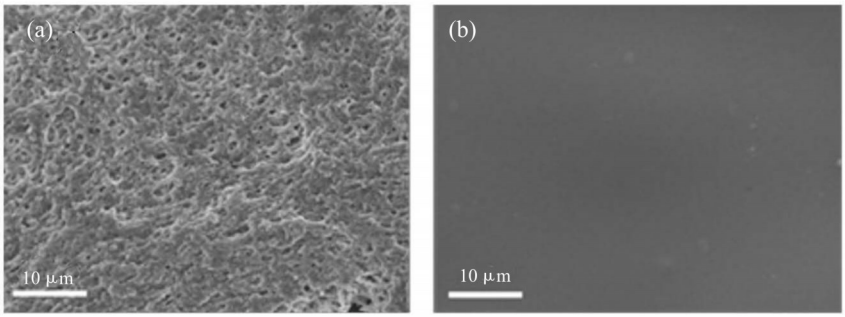


Fig. 1 SEM of (a)bare carbon electrode and (b)MIP film modified electrode

蛋白质溶液的体积，mL；W——MIP膜与NIP膜的质量，g。比较MIP膜与NIP膜对蛋白质吸附量的差别，计算蛋白质印迹膜的印迹效率（IF），计算方法为

$$IF = \frac{Q_{MIP}}{Q_{NIP}} \tag{4}$$

式中：Q_{MIP}——印迹膜的平衡吸附量；Q_{NIP}——非印迹膜的平衡吸附量。

1.4.6 电化学性能测试：BSA分子印迹电化学传感器的性能测试均采用电化学工作站(PGSTAT 302N，瑞士万通)进行，其中自制的修饰电极为工作电极，裸碳电极和铂电极分别为参比电极和辅助电极。CV的扫描范围为－200 mV~＋600 mV，扫描速率为100 mV/s。DPV的扫描范围为－0.4 V~＋0.4 V，扫描速率为10 mV/s。所有电化学实验均在含有1.0 mmol/L $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$和0.4 mol/L KCl的Tris-HCl(pH=7.4)缓冲溶液中进行。

2　结果与讨论

2.1　MIP水凝胶膜修饰电极的形貌

Fig.1为MIP水凝胶膜(CMWCNTs质量为NaAlg的2%)修饰前后电极的SEM图。从Fig.1(a)可看到，裸碳电极表面呈现出凹凸不平、沟壑交错的平面分布，这增加了碳电极的表面粗糙度，提高了与聚合物的界面结合能力。电极表面经MIP水凝胶修饰后非常光滑，这是因为CaAlg膜表面光滑平整[18]。

2.2　MIP水凝胶膜的红外光谱

Fig.2为CaAlg水凝胶膜和MIP水凝胶膜(CMWCNTs质量为NaAlg的2%)的红外光谱图。与CaAlg相比，MIP曲线出现了新峰。1645 cm^{-1}处的吸收峰大大增强，为C=O的特征峰，这归因于CMCNTs加入到CaAlg体系中。3175 cm^{-1}处为—NH_2对称伸缩振动的特征吸收峰；1599 cm^{-1}处为N—H键变形振动的吸收峰；1117 cm^{-1}处为N—C键的吸收峰。

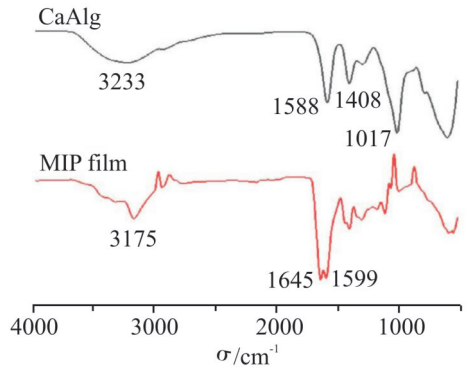


Fig. 2 Infrared spectra of CaAlg and MIP film

2.3　MIP水凝胶膜的力学性能和溶胀性能

Fig.3(a)为不同CMWCNTs含量MIP膜的弹性模量及断裂能。随着CMWCNTs含量的不断增加，MIP膜的弹性模量、断裂能也随之增大。当CMWCNTs质量分数达到2%时，弹性模量达到最大值7.8 MPa，断裂能达到11.53 kJ/m^2，约为CaAlg膜的3倍。但随着CMWCNTs含量的继续增加，MIP膜的力学性能不增反降，是因为过量的CMWCNTs分散不均匀，在CaAlg中出现团聚现象，使得膜内部受力不均，从而影响了膜的力学性能。

Fig.3(b)为MIP膜的溶胀平衡曲线。随着CMWCNTs含量的增加，膜的抗溶胀性能也大大增强，与CaAlg膜相比，MIP膜的抗溶胀性能提高了4倍。这是因为引入CMWCNTs后，其表面的羧基可以通过离子键与CaAlg中的Ca^{2+}相互作用形成双重交联体系，大大阻止了水凝胶膜的溶胀过程。CMWCNTs的加入量越大，MIP膜的抗溶胀性能越好。

2.4　MIP水凝胶膜的吸附性能

2.4.1 不同厚度的水凝胶膜对BSA的吸附：从Fig.4

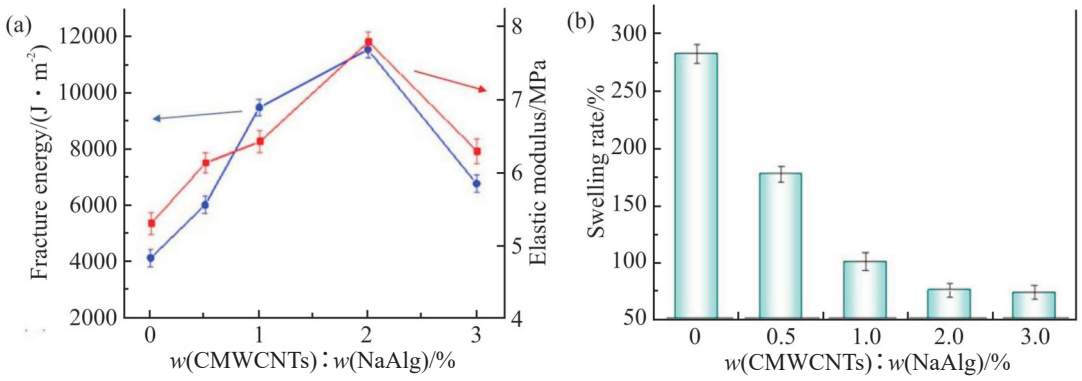


Fig. 3 (a)Mechanical properties and (b)swelling rate of MIP hydrogel films prepared at different CMWCNTs contents

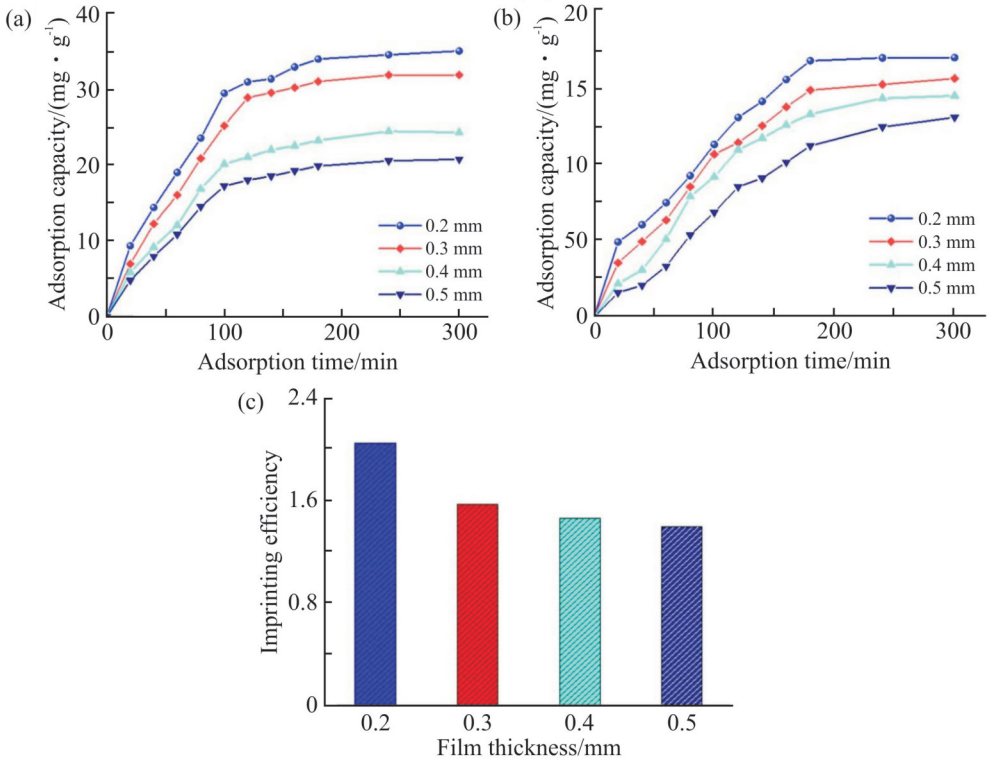


Fig. 4 BSA adsorption capacity of (a)MIP and (b)NIP film with different thickness, and (c)the imprinting efficiency of MIP film

(a)看出，厚度为0.2 mm的水凝胶膜对BSA的吸附量最大，达到了35.04 mg/g。随着膜厚度增加，其对BSA的吸附能力也逐渐减弱。这是因为水凝胶越薄，模板分子就越容易暴露于膜表面，也更容易将模板分子洗脱掉；随着膜厚度增加，包埋在膜内部的部分模板分子由于体积过大而无法洗脱出来，于是单位质量所形成的印迹孔穴便相应减少，因此，较薄的膜具有更好的吸附效果。对于NIP膜而言，膜厚度对BSA的吸附量几乎没有影响，因为NIP膜不存在吸附BSA的印迹空穴，其对BSA的吸附能力较MIP膜弱。如Fig.4(c)所示，厚度为0.2 mm的MIP膜印迹效率为2.02。

2.4.2 不同pH值洗脱液对BSA吸附的影响：Fig.5为不同pH的Tris-HCl洗脱液洗脱后MIP和NIP膜对BSA的吸附。可以看出，pH值为7.4的Tris-HCl洗脱后吸附效果最佳。当洗脱溶液pH值超过7.4时，MIP膜结构会在洗脱过程中受到破坏，从而导致吸附能力下降。因此在后续实验中选择pH值为7.4的

Tris-HCl洗脱液。

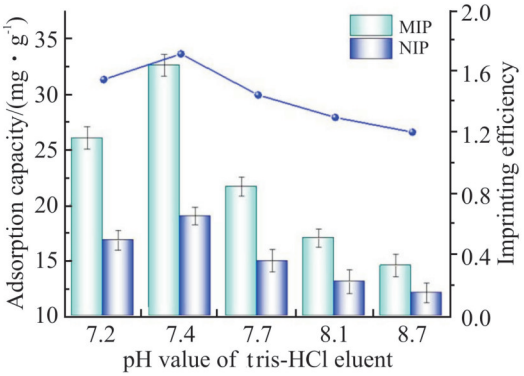


Fig. 5　Effect of different pH eluents on adsorption of BSA and imprinting efficiency

2.5　电化学测试

2.5.1　不同修饰电极的电化学性能:Fig.6(a)为裸碳电极及不同CMWCNT含量MIP修饰电极的电化学阻抗谱(EIS),5条曲线均由半圆和直线构成。半圆直径代表电子转移电阻,直径越小,电阻越小,而线性直线代表扩散受限部分。从Fig.6(a)中可以看出,相比于裸碳电极,纯海藻酸钙修饰电极的电子转移阻力增加,这是由于负载的海藻酸钙水凝胶阻碍了电极表面的电子传递;添加CMWCNT的水凝胶修饰电极的电阻相对减小,是因为膜中的羧化多壁碳纳米管具有良好的导电性,增加了电子转移能力,CMWCNT含量越高,电子转移能力越强。使用CMWCNTs质量分数为2%的MIP修饰电极进行DPV测试,Fig.6(b)为不同电极的DPV响应电流曲线。MIP修饰电极(曲线2)的峰值电流值明显高于裸碳电极(曲线1),当MIP修饰电极洗脱模板后,DPV峰值电流值继续增大(曲线3),这说明模板分子已经被洗脱出来而留下了印迹孔穴,给$[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$电子提供了向电极表面扩散的通道,导致电流值增加。将洗脱后的电极重新在BSA溶液中孵育,电极的电流响应值出现降低趋势(曲线4),这是因为模板分子重新占据了印迹孔穴,阻碍了

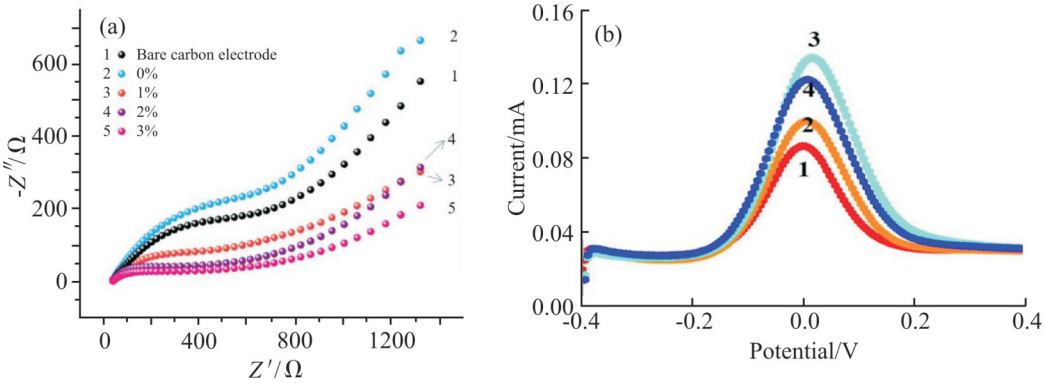


Fig. 6　(a)EIS and (b)DPV curves of different electrodes: ((1)bare carbon electrode; (2)MIP modified electrode; (3)MIP electrode after template elution; (4)MIP electrode incubated in 1.0 ×10⁻⁴ mg/mL template molecular solution)

电子传递。这也进一步说明电极表面存在可识别模板分子的印迹孔穴。

2.5.2　MIP修饰电极的选择性:Fig.7显示了MIP和NIP电化学传感器分别在BSA,OVA,BHb和Lys中孵育后的CV响应电流值。可以看出,MIP电化学传感器对BSA的电流响应变化值(ΔI)远远高于其他类似物,这意味着MIP电化学传感器上具有多重识别位点并在空间构型与尺寸大小上只与模板分子相匹配,而其他同源蛋白质因其空间结构、形状大小与BSA不同,因此无法与MIP电化学传感器上的印迹孔穴重新结合。对于NIP电化学传感器而言,对所有蛋白质的电流响应都非常小,原因是NIP中不存在能够吸附蛋白质的印迹孔穴。

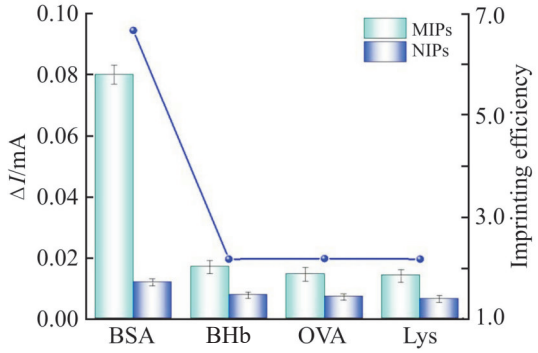


Fig. 7　Current responses of MIP and NIP electrode for BSA and BSA structural analogs

3 结论

将CMWCNTs引入NaAlg水凝胶体系中，通过$CaCl_2$溶液交联构建了CMWCNTs与CaAlg双重交联结构，这种结构大大增强了MIP水凝胶膜的力学性能与抗溶胀性能。将膜负载于丝网印刷碳电极上，成功制备了MIP电化学传感器。MIP水凝胶膜的最佳制备条件为CMWCNTs质量分数为2%，膜厚度0.2 mm，用pH=7.4的洗脱液除去BSA模板分子。此时膜对BSA吸附量最大，达到了35.04 mg/g。将MIP膜修饰于丝网印刷碳电极表面构建了MIP电化学传感器，通过DPV方法可以看出该传感器表面存在与模板分子相匹配的结合位点。与NIP修饰电极相比，MIP修饰电极对BSA表现出较高的选择识别性。本文中的制备方法简单，使用无毒无害物质，便于大规模生产，得到的电化学传感器在蛋白质监测和食品分析领域具有应用前景。

参考文献：

[1] Song Z, Li J, Lu W, *et al*. Molecularly imprinted polymers based materials and their applications in chromatographic and electrophoretic separations[J]. Trac Trends in Analytical Chemistry, 2022, 146: 116504

[2] 蒋旭红,张汉辉,周昱喆,等. 喜树碱分子印迹聚合物的计算机模拟及性能[J]. 高分子材料科学与工程. 2021, 37(6): 99-108.
Jiang X H, Zhang H H, Zhou Y Z, *et al*. Computer simulation and performance of camptothecin molecularly imprinted polymers[J]. Polymer Materials Science & Engineering, 2021, 37(6): 99-108.

[3] Yang Z, Xu J, Wang J, *et al.* Design and preparation of self-driven BSA surface imprinted tubular carbon nanofibers and their specific adsorption performance[J]. Chemical Engineering Journal, 2019, 373: 923-934,

[4] Pirzada M, Sehit E, Altintas Z, *et al.* Cancer biomarker detection in human serum samples using nanoparticle decorated epitope-mediated hybrid MIP[J]. Biosensors & Bioelectronics, 2020,166: 112464.

[5] Zhang S, Geryak R, Geldmeier J, *et al.* Synthesis, assembly and applications of hybrid nanostructures for biosensing[J]. Chemical Reviews, 2017, 117: 12942-13038.

[6] Gong C B, Yang Y Z, Yang Y H, *et al.* Photoresponsive hollow molecularly imprinted polymer for the determination of trace bisphenol A in water[J]. Journal of Colloid and Interface Science, 2016, 481: 236-244.

[7] Xu Z, Liu G, Huang J, *et al.* Novel glucose-responsive antioxidant hybrid hydrogel for enhanced diabetic wound repair[J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2022,14: 7680-7689.

[8] Yang C, Ji X F, Cao W Q, *et al.* An ultra sensitive and selective impedance sensor based on protein-imprinted polymer[J]. Sensors & Actuators B: Chemical, 2019, 282: 818-823.

[9] You M, Yang S, Tang W, *et al.* Ultrasensitive electro- chemical detection of glycoprotein based on boronate affinity sandwich assay and signal amplification with functionalized SiO_2@Au nanocomposites[J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2017, 9: 13855-13864.

[10] Yang Z, Xu J, Wang J, *et al.* Design and preparation of self-driven BSA surface imprinted tubular carbon nano- fibers and their specific adsorption performance[J]. Chemical Engineering Journal, 2019, 373: 923-934.

[11] Yarman A, Kurbanoglu S, Zebger I, *et al.* Simple and robust: the claims of protein sensing by molecularly imprinted polymers[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2021, 330: 129369.

[12] Zhao W, Li B, Xu S, *et al.* A fabrication strategy for protein sensors based on an electroactive molecularly imprinted polymer: cases of bovine serum albumin and trypsin sensing[J]. Analytica Chimica Acta, 2020, 1117: 25-34.

[13] Qian L W, Hu X L, *et al.* Thermal preparation of lysozyme-imprinted microspheres by using ionic liquid as a stabilizer[J]. Analytical & Bioanalytical Chemistry, 2014, 406: 7221-7231.

[14] Qian L W,Liu W Q,Yang M X, *et al.* Zwitterionic polymer chain-assisted lysozyme imprinted core-shell carbon microspheres with enhanced recognition and selectivity[J]. Talanta, 2020, 217: 121085.

[15] Luo J, Huang J, Wu Y, *et al.* Synthesis of hydrophilic and conductive molecularly imprinted polyaniline particles for the sensitive and selective protein detection[J]. Biosensors &

Bioelectronics, 2017, 94: 39-46.

[16] Xavier J R, Thakur T, Desai P, *et al.* Bioactive nanoengineered hydrogels for bone tissue engineering: a growth- factor- free approach[J]. ACS Nano, 2015, 9:3109-3118.

[17] Culver H R, Clegg J R, Peppas N A. Analyte- responsive hydrogels: intelligent materials for biosensing and drug delivery [J]. Accounts of Chemical Research, 2017, 50: 170-178.

[18] Cheng L, Guo Z, Lin Y, *et al.* Bovine serum albumin molecularly imprinted electrochemical sensors modified by carboxylated multi- walled carbon nanotubes/CaAlg hydrogels[J]. Gels, 2023, 9: 673.

[19] Wei Y, Zeng Q, Hu Q, *et al.* Self-cleaned electrochemical protein imprinting biosensor basing on a thermo- responsive memory hydrogel[J]. Biosensors and Bioelectronic, 2018, 99: 136-141.

Protein Molecularly Imprinted Carboxylated Multi-Walled Carbon Nanotubes/ CaAlg Hydrogel Film and Its Modified Electrochemical Sensor

Xinyue Gao, Zhilong Guo, Peng Dong, Huike Xie, Shichao Zhang, Jiansheng Jiang, Kongyin Zhao,Yanhui Hou

(*School of Materials Science and Engineering, Tiangong University, Tianjin 300387, China*)

ABSTRACT：The BSA molecularly imprinted carboxylated multi- walled carbon nanotubes (CMWCNTs) hydrogel composite films were prepared by crosslinking with $CaCl_2$ solution, using bovine serum albumin (BSA) as template and natural macromolecule sodium alginate (NaAlg) as functional monomer, while the non- imprinted film (NIP) was prepared without template. The effects of CMWCNTs content on the mechanical properties of the films and the effects of film thickness and pH value of eluents on the adsorption properties of BSA were studied. The selective adsorption of MIP film was studied by comparing the adsorption capacity of MIP films to different proteins. The results show that when the mass fraction of CMWCNTs is 2% of NaAlg mass, the hydrogel film has good swelling and mechanical properties. When the film thickness is 0.2 mm and the pH value of the eluent is 7.4, the adsorption effect of the hydrogel film on BSA is the best, reaching 35.04 mg/g. The MIP is loaded on the surface of bare carbon, and the performance of the modified electrode was measured by cyclic voltammetry (CV) and differential pulse voltammetry (DPV). The results show that compared with NIP modified electrode, the MIP modified electrode shows a higher selective recognition to BSA.

Keywords: protein molecular imprinting; calcium alginate hydrogel; carboxylated multi- walled carbon nanotubes; electrochemical sensor