

DOI: 10.13652/j.issn.1003-5788.2019.12.002

基于硼亲和策略的分子印迹技术研究进展

Research progress of molecular imprinting technology based on boron affinity strategy

徐 斐 郭 猛 叶 泰 袁 敏 曹 慧 于劲松

XU Fei GUO Meng YE Tai YUAN Min CAO Hui YU Jing-song

袁 然 徐晓喆 史景灏 苑红恩

YUAN Ran XU Xiao-zhe SHI Jing-hao YUAN Hong-en

(上海理工大学医疗器械与食品学院, 上海 200093)

(School of Medical Instrument and Food Engineering, University of Shanghai for Science
and Technology, Shanghai 200093, China)

摘要:基于硼酸配基与顺式二羟基化合物的可逆共价结合, 硼亲和和分子印迹技术具有印迹效率高、亲和力强以及 pH 调控的结合与释放等优势, 被广泛应用于含有顺式二羟基配基分子的分离与富集。文章介绍了硼亲和和分子印迹技术在核苷酸、糖、糖蛋白、细胞和细菌识别及富集中的应用, 并对其发展前景进行了展望。

关键词:分子印迹; 硼亲和; 顺式二羟基生物分子; 分离富集

Abstract: Boron affinity molecular imprinting technology has the advantages of high imprinting efficiency, strong affinity, and the combination and release of pH regulation because of the reversible covalent binding of boric acid ligands to cis-dihydroxy compounds, and it is widely used in separation and enrichment of cis-diol complexes base molecule. We introduced the application of boron affinity molecular imprinting technology in the identification and enrichment of nucleotides, sugars, glycoproteins, cells and bacteria, and prospected for the future development of this technology.

Keywords: molecular imprinting; boron affinity; cisdiol biomolecule; separation and enrichment

核苷、糖类、多聚糖和糖蛋白等一类含有顺式二羟基的生物分子在代谢组学、糖组学和蛋白质组学等研究领域具有重要意义。但生物样品中, 含有顺式二羟基的生物分子含量较低, 并且高浓度的干扰组分严重影响检测的灵

敏度和准确性。因此, 针对具有顺式二羟基的生物分子的选择性富集显得尤为重要。在众多分离富集方法中, 基于与顺式二羟基化合物的可逆共价结合作用实现分离富集的硼亲和策略引起研究者的广泛关注^[1]。pH 值调控的可逆共价结合作用是硼亲和策略实现选择性富集的关键, 硼酸盐与顺式二羟基物质的结合、解离取决于其结合特性。当溶液 pH 高于硼酸配基的 pKa 值时, 硼酸盐可以与含有顺式二羟基的物质形成五元或六元环酯; 当溶液 pH 为酸性时, 硼酸—顺式二羟基复合物自动解离。这种可逆的共价结合作用, 赋予硼亲和材料广谱选择性、pH 调控结合与释放、较快的解吸速度等特性。但是, 传统硼亲和材料也存在一些局限性: 硼酸配基较高的 pKa 值, 导致只能在碱性条件下才能实现共价结合作用, 生物兼容性较差; 选择性较差, 由于硼酸配基对顺式二羟基结构的广谱性识别, 无法满足对特定目标的选择性富集; 亲和力较低, 大多数硼基材料 Kd 值为 $10^{-5} \sim 10^{-7}$, 低丰度靶标富集时易受干扰。

分子印迹技术 (molecular imprinted technology, MIT) 是以特定的分子作为模板, 通过与功能单体相互作用形成配合物, 经过聚合、洗脱, 在聚合物表面或内部形成具有选择性的识别空腔^[2]。分子印迹聚合物空腔的可设计性, 特异性识别能力在纯化和分离^[3]、化学/生物传感器^[4]、抗体的生物识别^[5-6]和药物的识别与释放^[7]等领域受到广泛关注。根据印迹方式, 分子印迹通常分为共价^[8]和非共价键印迹^[9], 其中非共价键印迹可以针对模板分子进行功能单体的选择与设计, 但预聚合中的动态平衡会导致聚合过程中形成大量非均一的印迹位点; 传统的共价键印迹方法虽然能够获得均一的印迹位点,

基金项目:国家自然科学基金(编号:31671934); 上海市科委科技支撑(农业重点科技攻关)项目(编号:17391901500)

作者简介:徐斐(1972—), 女, 上海理工大学教授, 博士。

E-mail: xufei8135@126.com

收稿日期:2019-08-03

但模板分子不易被去除,吸附位点较少。

因此,将硼亲和策略与分子印迹技术相结合,硼亲和的可逆共价结合反应有利于模板分子的印迹与去除^[10-13];同时,分子印迹所构筑的选择性空腔^[14],不仅能提高硼亲和材料的选择性能,利用纳米尺寸印迹空腔的限域效应^[15-16],还可以进一步提高硼基材料对含有顺式二醇结构分子的亲和能力,实现快速、稳定、有选择性的富集含有顺式二醇的生物分子。结合最新的研究,文章总结硼亲和分子印迹技术在富集核苷、糖类、多聚糖和糖蛋白等方面的研究进展,并对该技术的发展前景进行展望,旨在拓宽分子印迹技术的应用范围。

1 硼亲和分子印迹技术的应用进展

1.1 核苷酸检测

核苷酸是 DNA 和 RNA 的重要组成部分,为生命体细胞代谢提供了信息,其在血液中的含量也可用于评估氧化应激^[17]。由于核苷酸分子量较小,而且能够用于反应结合的官能团也较少,因此研究出一种能够高效、特异性富集分离核苷酸的方法显得尤为重要。

利用制备分子印迹聚合物时所形成的选择性空腔,可以特异性识别模板核苷酸^[18],Longo 等^[19]以乙酰乙酸甲酯(MAA)为功能单体,9-乙基腺嘌呤(9-EA)为模板分子,乙二醇二甲基丙烯酸酯(EGDMA)与 *N,N*-(1,2-亚苯基)二(2-甲基-2-甲基丙酰胺)(PDBMP)分别作为交联剂与引发剂进行引发聚合,制备了含有腺嘌呤识别位点的分子印迹聚合物(MIP),制备的 MIP 虽然具有较好的吸附容量和较高的印迹因子,但达到吸附平衡的时间较长(35 min),且聚合环境中有毒试剂较多。Nesim 等^[20]制备了一种丙烯酰胺苯基硼酸分子印迹聚合物,用于选择性富集核苷酸。以苯硼酸化的丙烯酸为功能单体,过硫酸铵为交联剂,相应的核糖核苷酸钠盐作为模板分子,通过电聚合方式在金电极表面形成核苷酸印迹膜,这种利用电聚合方式制备的印迹膜吸附容量可达 76 mg/g,印迹因子为 8.6,具有很好的选择性。同时溶液中的腺嘌呤浓度达到纳摩尔水平就可以产生明显的电信号,表明该方法具有很好的灵敏度,同时聚合环境中有毒试剂较少。

为了进一步提高印迹聚合物的热稳定性和对核苷的吸附效果,Hu 等^[21]制备了一种具备高吸附能力的 MIPs(硼酸盐亲和核壳结构分子印迹),以胞苷、尿苷、肌苷、鸟苷为模板分子,氨基苯硼酸(APBA)改性的 MAA 为功能单体,二氧化硅为载体,EDGMA 为交联剂制备了印迹聚合物,结果表明 MIPs 在 300 °C 以下具有良好的稳定性,在 600 °C 以上完全分解。通过 HPLC 固相萃取柱分析得出,当使用 5% 三氟乙酸/乙腈(7:3,体积比)混合溶液为洗脱液,洗脱液体积为 0.4 mL 时,洗脱后溶液中模板分子的峰面积最高,相对应的峰面积达 1.79×10^5 , $1.40 \times$

10^6 ,表明该条件下的洗脱环境最好。当样品 pH 为 9 时,吸附后通过液相方法分析,核苷峰面积最高为 1.57×10^5 ,表明该条件下 MIPs 的吸附效果最好,同时所使用的载体二氧化硅具有特殊的中间结构,具有较大的比表面积,在通过 SPE 柱时,可以吸附更多的模板分子,吸附效率进一步提高。

1.2 糖类及其衍生物检测

糖类是一类重要的生物分子,在实际应用中具有重要的作用。大多数糖类只有一种具有不同立体化学性质的官能团(羟基),使得其对不同糖类的识别极为困难。苯硼酸对于含有顺式二羟基的物质具有很好的亲和力,能够快速与糖类物质结合,分子印迹技术可以赋予这个过程以选择性^[22]。Tan 等^[23]以 *D*-果糖与 *D*-木糖为模板分子,硼酸改性的 3-异氰酸根合丙基三乙氧基硅烷作为功能单体,利用硼亲和表面分子印迹策略制备了一种表面荧光分子印迹传感器,用于选择性分离糖类。试验中利用四乙氧基硅烷(TEOS)在碱性条件下缩合形成的 SiO₂ 为载体,结合硼亲和分子印迹技术,制备得到了一种双模板分子印迹聚合物。与以往的果糖—木糖分子印迹聚合物(吸附容量 18.7 mg/g)相比,制备出的表面分子印迹聚合物的吸附容量达 32 mg/g,由于表面分子印迹聚合物的表面具有更多的吸附位点与印迹空腔,同时在引入 3-异氰酸根合丙基三乙氧基硅烷后,可以通过荧光的变化更方便地判断模板分子是否被洗脱下来,为判断模板分子是否洗脱完全提供了有利条件。

为了进一步提高印迹聚合物对模板分子的选择性和灵敏度,Bhavana 等^[24]以果糖为模板分子,先将果糖与三氨基苯硼酸(APBA)预结合,在氟化物存在的情况下,采用电聚合方式使 APBA 在电极表面自聚得到果糖分子印迹聚合物,相比以往制备的印迹聚合物,这种利用电聚合方式制备得到的印迹聚合物对 *D*-果糖的选择性提高了 25%,由于印迹膜附着在电极表面,提高了对 *D*-果糖的检测灵敏度。

葡萄糖是生物进行生命活动的能量来源,同时也是糖尿病的检测目标。多数单糖除了立体结构的差异外并没有其他结构区别,因此很难将葡萄糖与其他单糖区分开来。Chen 等^[25]制备了一种光引发的硼酸亲和分子印迹生物相容性探针,用于葡萄糖的特异性检测,以 4-乙烯基苯硼酸(VPBA)为功能单体,葡萄糖为模板分子,聚乙二醇为致孔剂,聚乙二醇二丙烯酸酯为交联剂,Irgacure 184 为紫外线引发剂,自聚方式制备了亲水性 MIP。在紫外引发聚合前将预聚物置于毛细管中,聚合结束后可以得到涂覆有 MIP 印迹层的毛细管探针。制备得到的 MIP 具有很好的亲水性,MIP 与葡萄糖的结合常数比其他简单苯基硼酸与葡萄糖的结合常数高 3 个数量级,吸附容量达 380 μg/g,GC-MS 检测葡萄糖的检测限为 0.7 μmol/L,

远远优于以往的检测器,因此在分析实际样品时可以充分稀释,降低复杂基质干扰。制备过程简单,同时可以准确控制探针表面的印迹层厚度,可以快速检测生物流体和半固体生物组织中的葡萄糖。Muhammad 等^[26]制备了一种基于硼亲和的微萃取探针,将印迹层印迹涂覆在有拉曼活性银纳米粒子的镀金探针表面,再将探针插入待检测的植物组织内,在葡萄糖或果糖与硼酸反应形成环酯后,再对探针表面进行分析。制备得到的探针具有较低检测限($1\ \mu\text{g}/\text{mL}$),检测时间为 20 min,探针表面的 MIP 对葡萄糖与果糖的印迹因子高达 12.9,相互作用强度达 $6.5\times 10^4\ \text{mol}/\text{L}$,探针在缓冲液中存储 2 个月后仍具有较高的稳定性,其信号强度仅降低了 14%,该探针可以快速检测一些药用植物以及草药植物组织中的一些功能性物质(含有顺式二醇结构),并不仅仅局限于单糖类化合物。

1.3 糖蛋白分离富集与检测

蛋白质分子印迹一直以来都是研究的热点^[27],由于较大的尺寸导致蛋白质难以从高度交联的聚合物网络中去除,蛋白质空间结构对环境的敏感性和大量潜在相互作用位点可能影响印迹聚合物的交叉反应性和非特异性吸附^[28]。为了克服这些缺陷,研究提出了多种印迹方法,如表面印迹^[29]、表位印迹^[30]、皮克林乳液聚合^[31]、分级印迹^[32]等印迹策略。其中表面/表位印迹是一种将印迹结合位点锚定在载体表面的方法,可以改善模板蛋白难以被去除的问题。但蛋白质结构对环境的敏感性、印迹过程中可能出现的交叉反应性及非特异性吸附仍未得到解决。将硼亲和策略引入蛋白分子印迹中,能够在保证蛋白结构的同时有效提高印迹的选择性。硼酸与糖蛋白的共价结合属于可逆反应,当溶液 pH 高于硼酸单体的 pKa 时,硼酸与糖蛋白形成共价复合物;当溶液 pH 低于硼酸的 pKa 值时,复合物自动解离,因此只需挑选合适的硼酸作为功能单体,制备出的分子印迹聚合物可以很好地选择性分离富集糖蛋白,同时苯硼酸自身的亲水性以及生物相容性也是其适用于生物分子印迹的一个重要因素^[10,33-34]。

Li 等^[35]报道了基于硼酸盐的糖蛋白表面印迹方法,以苯胺、3-氨基苯硼酸(APBA)和丙烯酸连续改性的磁性 $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{Au}$ 纳米颗粒(NPs)作为芯材料,引入硼酸和可聚合双键,以辣根过氧化物酶(HRP)为模板,通过单体在多功能 NPs 表面上的自由基诱导接枝共聚制备蛋白印迹薄膜。该条件下制备的分子印迹聚合物具有较高的印迹因子(7.80),较高的吸附容量($38\ \text{mg}/\text{g}$)。MIP 在 90 min 内达到 $0.3\ \text{mg}/\text{mL}$ 的饱和和吸附,而非印迹聚合物则需要 220 min。将制备的 MIP 涂覆在电极表面可用于电化学检测辣根过氧化物酶(HRP),在 $0.01\sim 0.30\ \text{mg}/\text{mL}$ 的浓度范围内具有良好的线性关系,该方法的检出限为

$0.005\ \text{mg}/\text{mL}$ 。

为了进一步提高印迹聚合物对蛋白质的选择性,Li 等^[36]利用光引发硼酸盐亲和分子印迹用于分离富集糖蛋白,将模板蛋白与乙烯基苯硼酸在 $\text{pH}\geq 8.0$ 的适当致孔剂溶液中混合形成预聚物,将预聚物与交联剂(PEGDA)和适当的 UV 引发剂混合,然后通过 UV 引发的自由基聚合方式,使预聚物快速聚合成聚合物,再使用适当的酸性溶液洗脱模板分子,留下与模板相对应的三维印迹空腔,制备好的印迹聚合物特异选择性强,印迹因子为 9.2。通常基于硼亲和的分子印迹需在碱性环境下才能实现对含有顺式二醇结构分子的识别,但通过 UV 引发制备出的 MIP 可以在 pH 为 6 的环境中对模板分子有明显的亲和力,可检测到模板蛋白的存在,拓宽了 MIP 的 pH 范围,无需对样品进行预处理。

同时,糖蛋白在多种生命活动中起着至关重要的作用,是疾病诊断和治疗靶标的重要生物标志物。但糖蛋白在体内的丰度很低,且干扰物质浓度较高。因此,开发出一种快速、准确识别目标糖蛋白,具有高度灵敏度的方法显得尤为重要。Sun 等^[37]将分子印迹技术与硼亲和相结合,制备了一种纸基电化学生物传感器,用于检测卵清蛋白(OVA)。先对载体二氧化硅进行一系列的修饰得到 $\text{SiO}_2@ \text{An}/\text{dsDNA}/\text{CeO}_2$ 作为电化学检测时的信号标签,然后以 4-巯基苯硼酸为功能单体制备糖蛋白印迹膜,最后将印迹膜附在电极表面进行电化学分析。制备出的电化学传感器可以用于检测 $1\ \text{pg}/\text{mL}\sim 1\ 000\ \text{ng}/\text{mL}$ 线性范围内的 OVA,检测限较低($0.87\ \text{pg}/\text{mL}$),对于临床诊断以及其他相关领域具有良好的应用前景。Zhu 等^[38]制备了一种硼亲和分子印迹聚合物,以更好的特异性分离富集卵清蛋白。首先通过蒸馏-沉淀聚合法制备四氧化三铁@甲基丙烯酸缩水甘油酯纳米粒子作为分子印迹载体,然后将氨基苯硼酸与乙二胺通过形成的 B-N 配位络合物固定在四氧化三铁@甲基丙烯酸缩水甘油酯纳米粒子表面作为功能单体,最后加入模板蛋白,通过自聚形成印迹层。制备的印迹聚合物不仅可以利用自身硼亲和作用吸附/解吸模板蛋白,同时其磁性特征可以在外加磁场时分离,重复利用性较好,制备的印迹聚合物对 OVA 的吸附容量达 $230.8\ \text{mg}/\text{g}$,印迹因子为 7.51,同时印迹聚合物在弱酸至弱碱性溶液中表现出较好的吸附性能,说明制备的印迹聚合物在生理条件下的复杂实际样品具有很好的应用前景。

1.4 细菌检测

细菌感染会造成严重的健康威胁,因此实现细菌病原体的早期检测和鉴定显得尤为重要。目前大多数检测方法是将抗体和亲和肽作为识别原件,但是抗体和亲和肽制备成本高、步骤繁多且贮存稳定性较差,同时还需配备精密的检测仪器和专业的试验人员。分子印迹聚合物

由于制备过程相对简单,良好的稳定性已被用于细菌的选择性检测^[39],且细菌表面存在大量富含顺式二醇的物质如磷壁酸、肽聚糖和细菌外壁上的脂多糖,易于通过硼亲和策略实现对细菌的识别。Mohsen 等^[40]以间氨基苯硼酸(3-PBA)为功能单体,葡萄糖球菌为模板细菌,采用电化学聚合的方法在电极表面制备出细菌印迹聚合物(CIP),采用果糖的竞争性置换去除模板细菌。结果表明,CIP 生物传感器在检测葡萄糖球菌时,在 $10^3 \sim 10^7$ CFU/mL 的浓度范围内表现出良好的线性关系。基于 CIP 的分子印迹传感器在浓度为 10 CFU/mL 情况下对检测模板细菌仍有响应,而 NIP 基本无响应,说明 CIP 在制备过程中形成了对模板细菌识别的印迹空腔,同时采用竞争性方法去除模板细菌,不会对细菌活性结构产生影响。

1.5 细胞检测

癌症是目前致死率最高的一类疾病,由癌症导致死亡的 90% 都是因为癌细胞发生了转移,因此,在人体血液中对癌细胞进行检测和隔离对于早期的诊断和治疗具有重要意义。用于分离细胞的技术大都基于细胞的物理或化学性质^[41],常规的方法有密度梯度离心^[42]、介电泳^[43],或是基于细胞大小、密度、电荷或迁移性质^[44],这些方法缺乏特异性,而用于特异性检测某种癌细胞的方法大都依赖于生物识别分子,尤其是抗体,但生物识别分子难以制备以及保存稳定性差(易失活)。癌变时,细胞表面通常会发生糖基化现象,可以利用硼酸对于这种含有顺式二醇的糖类化合物具有的亲和力将硼亲和与分子印迹结合起来,用于分离和检测癌细胞^[45]。Wang 等^[46]制备了一种单糖荧光分子印迹聚合物用于靶向识别癌细胞,以硼酸修饰的二氧化硅荧光纳米粒子为载体,分别以唾液酸、岩藻糖和甘露糖为模板分子,四乙氧基硅烷为交联剂,利用硼亲和和分子印迹技术制备了不同模板印迹的二氧化硅荧光纳米粒子(MIP),用于癌细胞的靶向识别与荧光成像,试验中未加入模板分子制备得到 NIP。结果表明,在干扰细胞与癌细胞同时存在的情况下,MIP 与癌细胞结合后呈现强荧光,而干扰细胞则无荧光,使用 NIP 作用两种细胞时,在荧光成像下均无荧光,这种方法有利于癌细胞检测,在对 MIP 与 NIP 染色后,印迹聚合物同样可以作为癌细胞成像的工具。相比常规的细胞检测手段,印迹聚合物易制备,具有良好的保存稳定性,尤其是在引入荧光色素后,为检测癌细胞的靶向识别与成像提供了有利条件。

将硼亲和和分子印迹与表面增强拉曼散射技术(SERS)相结合,Yin 等^[47]以唾液酸(SA)为模板分子,以具有表面增强拉曼效应的银纳米粒子(AgNPs)为载体,通过 TEOS(交联剂)在含有氨水的乙醇溶液中缩聚反应得到表面分子印迹聚合物,用于识别表面含有唾液酸残

基的癌细胞,从而针对正常细胞、癌细胞和组织进行选择成像。将 SA 印迹的银纳米粒子与癌细胞和正常细胞分别作用一段时间后,癌细胞出现很强的 SERS 信号,而正常细胞基本无信号。基于硼亲和和分子印迹制备的 SERS 探针克服了使用传统抗体探针难于制备、易于降解的缺点,改变 SERS 探针中的印迹模板可以扩展到其他癌症标记物的识别与成像。为更灵敏地检测癌变细胞表面的唾液酸,Shinde 等^[48]制备了一种荧光核壳结构的分子印迹聚合物,以 SA 为模板分子,乙烯基苯硼酸为功能单体,EDGNA 为交联剂,硝基苯并恶二唑为荧光标记基团,采用自由基聚合方式制备得到 MIP,结果表明,MIP 与 SA 的相互作用强度达 6.6×10^5 mol/L,而葡萄糖醛酸及其他单糖与 MIP 的相互作用强度最高为 1.8×10^5 mol/L,在细胞成像试验中,表面有唾液酸表达形成聚糖的细胞会被染色聚集,而正常细胞没有这种现象,该方法可应用于低浓度的唾液酸检测,具有较好的临床应用价值。

2 硼亲和和分子印迹技术的发展方向

目前关于核苷酸、细菌、细胞等物质的分子印迹技术虽然已经有了较为长远的发展,但是由于此类物质本身并未含有较多可以印迹的官能团,因此印迹效果不理想,硼亲和策略的引入使得分子印迹技术在方法学上被推向了新的高度,高效、准确、可控的优点,使得硼亲和和分子印迹成为了研究热点。药物分析、疾病诊断、癌细胞的成像与靶向治疗等方面的应用,使得硼亲和和分子印迹技术的发展方向不再局限于某一类化学物质的检测,同样可以应用于临床等方面(抗体的高效、选择性萃取、酶活性分析等)。

3 总结

基于硼亲和和分子印迹技术的迅速发展,尤其是对核苷酸、糖、糖蛋白、细胞和细菌识别及富集中具有显著的优势。但硼亲和和分子印迹技术仍存在不足,主要体现在:① 在制备硼亲和和分子印迹过程中仍需加入氟化钠、过硫酸铵等有毒有害试剂,试验大都在有机相中进行,而用于水相印迹的体系较少,同时如何实现印迹层的可控制备和定向印迹仍需进一步研究。② 硼亲和和分子印迹技术目前仅限于含有顺式二醇结构的物质,如何拓展到其他分子或离子印迹中仍有待研究。③ 进一步拓展硼亲和和分子印迹聚合物在不同光电传质界面上的应用。

参考文献

- [1] LI Don-jing, CHEN Yang, LIU Zhen. Boronate affinity materials for separation and molecular recognition: Structure, properties and applications[J]. Chem Soc Rev, 2015, 44 (22): 8 097-8 124.

- [2] LIU Zhen, HE Hui. Synthesis and applications of boronate affinity materials; From class selectivity to biomimetic specificity[J]. *Acc Chem Res*, 2017, 50(9): 2 185-2 193.
- [3] VIDYASANKAR S, ARNOLD H. Molecular imprinting; Selective materials for separations, sensors and catalysis[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 1995, 6(2): 218-224.
- [4] SHARMA P S, PIETRZYK-LE A, D'SOUZA F, et al. Electrochemically synthesized polymers in molecular imprinting for chemical sensing[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2012, 402(10): 3 177-3 204.
- [5] RAMSTTÖM O, YE L, MOSBACH K. Artificial antibodies to corticosteroids prepared by molecular imprinting [J]. *Chemistry & Biology* 1996, 3(6): 471-477.
- [6] SELLERGRÉN B, MAIN Z, GERMAN Y. Noncovalent molecular imprinting; Antibody-like molecular recognition in polymeric network materials[J]. *Trends in Analytical Chemistry*, 1997, 16(6): 310-320.
- [7] CHEONG S H, MCNIVEN S, RACHKOV A, et al. Testosterone receptor binding mimic constructed using molecular imprinting [J]. *Macromolecules*, 1997(30): 1 317-1 320.
- [8] KHASAWN M A, VALLANO P T, REMCHO V T. Affinity screening by packed capillary high performance liquid chromatography using molecular imprinted sorbents II; Covalent imprinted polymers[J]. *Journal of Chromatography A*, 2001, 922(1/2): 87-97.
- [9] RAMSTRIIM O, NICHOLLS I A, MOSBACH K. Synthetic peptide receptor mimics; Highly stereoselective recognition in non-covalent molecularly imprinted polymers[J]. *Terraktron; Asymmetry*, 1994, 5(4): 649-656.
- [10] LI Dao-jing, WANG Nan, WANG Fang-fang, et al. Boronate affinity-based surface-imprinted quantum dots as novel fluorescent nanosensors for the rapid and efficient detection of rutin[J]. *Analytical Methods*, 2019, 11(25): 3 212-3 220.
- [11] HUANG Wei, HOU Xing-yu, TONG Yu-kui, et al. Determination of sialic acid in serum samples by dispersive solid-phase extraction based on boronate-affinity magnetic hollow molecularly imprinted polymer sorbent[J]. *RSC Advances*, 2019, 9(10): 5 394-5 401.
- [12] BIE Zi-jun, ZHAO Wei-man, LV Zhong-yuan, et al. Preparation of salbutamol imprinted magnetic nanoparticles via boronate affinity oriented surface imprinting for the selective analysis of trace salbutamol residues[J]. *The Analyst*, 2019, 144(9): 3 128-3 135.
- [13] HU Yue, XIA Qin-fei, HUANG Wei-huang, et al. Boronate-modified hollow molecularly imprinted polymers for selective enrichment of glycosides[J]. *Microchimica Acta*, 2017, 185(1): 46-55.
- [14] PILETSKY S A, PILETSKAYA E V, YANO K, et al. A biomimetic receptor system for sialic acid based on molecular imprinting[J]. *Analytical Letters*, 1996, 29(2): 157-170.
- [15] PAN J, CHEN W, MA Y, et al. Molecularly imprinted polymers as receptor mimics for selective cell recognition [J]. *Chemical Society Reviews*, 2018, 47(15): 5 574-5 587.
- [16] FRANZ L, DICKER T, HAYDEN O. Molecular imprinting in chemical sensing[J]. *Trends in Analytical Chemistry*, 1999, 18(3): 192-199.
- [17] MATEOS-VIVAS M, RODRIGUEZ-GONZALO E, GARCIA-GOMEZ D, et al. Hydrophilic interaction chromatography coupled to tandem mass spectrometry in the presence of hydrophilic ion-pairing reagents for the separation of nucleosides and nucleotide mono-, di- and triphosphates[J]. *J Chromatogr A*, 2015, 1 414(8): 129-137.
- [18] HUANG Yi-chen, LIN Chun-chi, LIU Chuen-ying. Preparation and evaluation of molecularly imprinted polymers based on 9-ethyladenine for the recognition of nucleotide bases in capillary electrochromatography[J]. *Electrophoresis*, 2004, 25(4/5): 554-561.
- [19] LONGO L, VASAPOLLO G. Molecularly imprinted polymers as nucleotide receptors[J]. *Mini-Reviews in Organic Chemistry*, 2008, 5(3): 163-170.
- [20] SALLACAN N, ZAYATS M, BOURENKO T, et al. Imprinting of nucleotide and monosaccharide recognition sites in acrylamidephenylboronic acid-acrylamide copolymer membranes associated with electronic transducers[J]. *Anal Chem*, 2002, 74(3): 702-712.
- [21] HU Yue, HUANG Wei, TONG Yu-kui, et al. Boronate-affinity hollow molecularly imprinted polymers for the selective extraction of nucleosides[J]. *New Journal of Chemistry*, 2017, 41(15): 7 133-7 141.
- [22] AWINO J K, GUNASEKARA R W, ZHAO Yan. Selective recognition of d-aldohexoses in water by boronic acid-functionalized, molecularly imprinted cross-linked micelles[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2016, 138(31): 9 759-9 762.
- [23] TAN Jin, WANG He-fang, YAN Xiu-ping. Discrimination of saccharides with a fluorescent molecular imprinting sensor array based on phenylboronic acid functionalized mesoporous silica[J]. *Anal Chem*, 2009, 81(13): 5 273-5 280.
- [24] DEOR E, BHAVAN A, FREUN D, et al. Saccharide imprinting of poly(aniline boronic acid) in the presence of fluoride[J]. *The Analyst*, 2003, 128(6): 803-806.
- [25] CHEN Guo-sheng, QIU Jun-lang, XUAN An-Fang, et al. Boronate affinity-molecularly imprinted biocompatible probe; An alternative for specific glucose monitoring [J]. *Chem Asian J*, 2016, 11(16): 2 240-2 245.
- [26] MUHAMMAD P, LIU Jia, XING Rong-rong, et al. Fast probing of glucose and fructose in plant tissues via plasmonic affinity sandwich assay with molecularly-

- imprinted extraction microprobes [J]. *Anal Chim Acta*, 2017, 995(44): 34-42.
- [27] WANG Yan-tian, ZHOU Yan-xiu, SOKOLOV J, et al. A potentiometric protein sensor built with surface molecular imprinting method[J]. *Biosens Bioelectron*, 2008, 24(1): 162-166.
- [28] NISHINO H, HUANG C S, SHEA K J. Selective protein capture by epitope imprinting [J]. *Angewandte Chemie*, 2006, 118(15): 2 452-2 456.
- [29] MARIA K, GLAD M, MOSBACH K. An approach towards surface imprinting using the enzyme ribonuclease A[J]. *Journal of Molecular Recognition*, 1995, 8(1/2): 35-39.
- [30] DANIEL S, PETER K. Molecular imprinting of peptides and proteins in aqueous media [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2007, 389(2): 399-404.
- [31] FERGUSON C J, HUGHES R H, PHAM B T T, et al. Effective ab initio emulsion polymerization under RAFT control[J]. *Macromolecules*, 2002, 35(25): 9 243-9 245.
- [32] CHEN Xi-gang, SUN Zhi-qiang, ZHENG Lin, et al. Colloidal-crystal-assisted imprint for mesoscopic structured arrays and hierarchical patterns [J]. *Advanced Materials*, 2004, 16(18): 1 632-1 636.
- [33] MO Gui-chun, HE Xin-xin, ZHOU Chun-qin, et al. A novel ECL sensor based on a boronate affinity molecular imprinting technique and functionalized SiO₂@CQDs/AuNPs/MPBA nanocomposites for sensitive determination of alpha-fetoprotein[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2019, 126(11): 558-564.
- [34] LI Dao-jin, TU Tian-yong, WU Xin-yuan. Efficient preparation of template immobilization-based boronate affinity surface-imprinted silica nanoparticles using poly(4-aminobenzyl alcohol) as an imprinting coating for glycoprotein recognition[J]. *Analytical Methods*, 2018, 10(36): 4 419-4 429.
- [35] LI Yan-xia, HONG Mei, MIAO Miao, et al. Novel composites of multifunctional Fe₃O₄@ Au nanofibers for highly efficient glycoprotein imprinting [J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2013, 1(7): 1 044-1 051.
- [36] LI Li, Yue Lu, ZI Jun-bie, et al. Photolithographic boronate affinity molecular imprinting: a general and facile approach for glycoprotein imprinting[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2013, 52(29): 7 451-7 455.
- [37] SUN Xiao-lu, JIAN Yan-nan, WANG H, et al. Ultrasensitive microfluidic paper-based electrochemical biosensor based on molecularly imprinted film and boronate affinity sandwich assay for glycoprotein detection [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2019, 11(17): 16 198-16 206.
- [38] ZHU Heng-jia, YAO Hang, XIA Ke-yu, et al. Magnetic nanoparticles combining teamed boronate affinity and surface imprinting for efficient selective recognition of glycoproteins under physiological pH [J]. *Chemical Engineering Journal*, 2018, 346(6): 317-328.
- [39] TEMPLIER V, ROUX A, ROUPIOZ Y, et al. Ligands for label-free detection of whole bacteria on biosensors: A review[J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2016, 79(5): 71-79.
- [40] GOLABI M, KURALAY F, JAGER E W H, et al. Electrochemical bacterial detection using poly(3-aminophenylboronic acid)-based imprinted polymer[J]. *Biosens Bioelectron*, 2017, 93(7): 87-113.
- [41] CHEN Jian, LI Jie-shen, SUN Yu. Microfluidic approaches for cancer cell detection, characterization, and separation[J]. *Lab Chip*, 2012, 12(10): 1 753-1 767.
- [42] BHAGAT A A, BOW H, HOU H W, et al. Microfluidics for cell separation[J]. *Med Biol Eng Comput*, 2010, 48(10): 999-1 014.
- [43] GASCOYNE P R C, WANG Xiao-bo, HUANG Ying, et al. Dielectrophoretic separation of cancer cells from blood[J]. *Transactions on Industry Applications*, 1997, 33(3): 670-678.
- [44] GREVE B, KELSCH R, SPANIOL K, et al. Flow cytometry in cancer stem cell analysis and separation [J]. *Cytometry A*, 2012, 81(4): 284-293.
- [45] OUYANG Jun, CHEN Ming, BAO Wen-Ying, et al. Morphology controlled poly(aminophenylboronic acid) nanostructures as smart substrates for enhanced capture and release of circulating tumor cells[J]. *Advanced Functional Materials*, 2015, 25(38): 6 122-6 130.
- [46] WANG Shuang-shou, YIN Dan-yang, WANG Wen-jing, et al. Targeting and imaging of cancer cells via monosaccharide-imprinted fluorescent nanoparticles[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6(1): 1-11.
- [47] YIN Dan-yang, WANG Shuang-shou, HE Yun-jie, et al. Surface-enhanced Raman scattering imaging of cancer cells and tissues via sialic acid-imprinted nanotags [J]. *Chem Commun (Camb)*, 2015, 51(100): 17 696-17 699.
- [48] SHINDE S, EL-SCHICH Z, MALAKPOUR A, et al. Sialic acid-imprinted fluorescent core-shell particles for selective labeling of cell surface glycans[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2015, 137(43): 13 908-13 912.