

固定化金属离子亲和色谱研究进展

韩彬

中国科学院植物研究所, 北京 100093

摘要 固定化金属离子亲和色谱是将过渡金属离子通过配体整合在固相基质上, 通过过渡金属离子与靶分子的组氨酸或半胱氨酸特异性结合形成相对稳定的复合物, 最后以竞争性洗脱方式实现靶分子的富集与纯化, 其核心为金属整合亲和基质材料制备。具有亲和选择性高、生物兼容性好、可逆再生等优势, 迄今已发展了40余年, 广泛应用于靶分子的特异性富集、分离与纯化, 本文综述了近3年固定化金属离子亲和色谱纳米材料、微球色谱基质、棉纤维、分子印迹材料、整体材料、共价有机骨架等方面的研究进展。

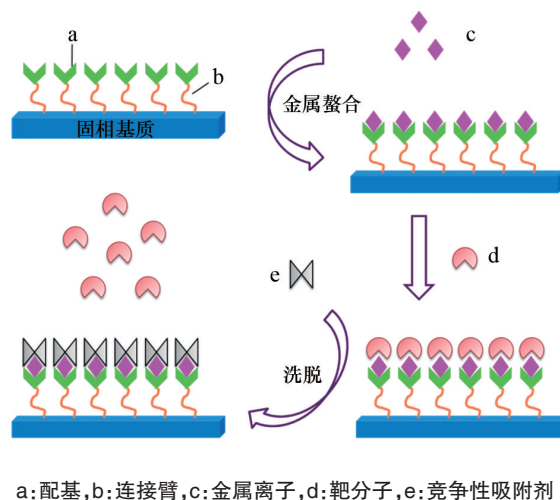
关键词 固定化金属离子亲和色谱; 富集; 纯化; 材料

固定化金属离子亲和色谱 (immobilized metal affinity chromatography, IMAC) 最初被称为金属螯合亲和色谱 (metal chelate affinity chromatography, MCAC), 由 Porath 等^[1]于 1975 年提出, 原理主要基于过渡金属离子 (Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Ni^{2+} 等), 在接近中性的水溶液中可特异性结合组氨酸或半胱氨酸形成相对稳定的复合物。Porath 等^[2-10]对螯合配体与金属离子的不同组合、金属离子的固载量、靶分子的结合能力及活性、溶液 pH 值等进行深入的研究, 为其作为分离纯化技术提供了理论支持。此外, Porath 等^[11]发现此技术还能用于分析组氨酸残基在蛋白分子中的位点、数量、表面密度及配位难易程度等。在 10 余年的研究过程中 IMAC 的概念也逐渐被接纳并固定下来。IMAC 可根据不同金属离子与螯合配体的多种组合制备形式多样的固定化金属离子亲和色谱基质, 应用于多种不同靶分子 (多肽、蛋白、酶等) 的亲亲和富集、分离、纯化, 且具有亲和选择性强、生物兼容性好、可逆再生性优等特点, 因此经过 40 余年的发展, IMAC 已在磷酸化肽富集及量化、蛋白纯化、适配体筛选等领域得到广泛应用^[12-15]。本文综述了近 3 年 IMAC 纳米材料、微球色谱基质、棉纤维、分子印迹材料、整体材料、共价有机骨架等方面的研究进展。

1 IMAC 原理

IMAC 的作用靶标主要为蛋白质、多肽等大分子, 其原理主要基于靶分子表面氨基酸与金属离子的亲和力强弱不同。过渡态金属离子能与电子供体氮、硫、氧等原子以配位键结合, 而金属离子剩余的空轨道是电子供体的配位点, 在

溶液中被水分子或阴离子占据^[16]。当靶分子表面的氨基酸残基与金属离子的结合力较强时, 氨基酸残基的供电原子 (如组氨酸残基的 N 原子、半胱氨酸残基的 S 原子) 将取代与金属离子结合的水分子或阴离子, 与金属离子形成复合物, 从而使相应的靶分子结合在亲和基质表面。氨基酸中的 α -氨基和 α -羧基, 以及某些氨基酸侧链基团含有孤对电子的活性原子都能参与螯合作用, 由于氨基酸的种类、数量、位置 and 空间构象不同, 因而与金属配基的亲合力不同^[17], 可选择性地加以分离纯化, 通过调节溶液 pH 值、添加竞争性洗脱剂 (如咪唑等) 将靶分子从亲和基质上洗脱, 原理如图 1 所示。靶分子在



a: 配基, b: 连接臂, c: 金属离子, d: 靶分子, e: 竞争性吸附剂

图 1 IMAC 原理示意

Fig. 1 Schematic diagram of IMAC principle

收稿日期: 2017-06-13; 修回日期: 2017-09-26

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (Y5718A1001)

作者简介: 韩彬, 工程师, 研究方向为亲和色谱, 电子邮箱: binhan@ibcas.ac.cn

引用格式: 韩彬. 固定化金属离子亲和色谱研究进展[J]. 科技导报, 2017, 35(22): 92-100; doi: 10.3981/j.issn.1000-7857.2017.22.012

金属螯合柱上的保留主要是靶分子和金属离子的配位作用、静电作用、疏水作用及 π 键作用的总和。

1.1 配位作用

过渡金属离子(Cu^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Co^{2+} 等)能与供电子基团(组氨酸残基的咪唑基、谷氨酸残基的羧基、半胱氨酸残基的巯基、色氨酸的吲哚基等)形成配位键,这些配位基团通常可看作弱场强配体,当与 Cu^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Co^{2+} 配位时,中心离子的d电子分布发生改变, Cu^{2+} 配位化合物晶体场稳定化能最低,加之 Cu^{2+} 半径最小,因此对靶分子的配位作用最强, Ni^{2+} 次之, Zn^{2+} 与 Co^{2+} 最弱^[18]。

1.2 静电作用

金属螯合配体在弱酸和碱性介质中通常带负电荷,与靶分子表面带负电荷的氨基酸残基(如天冬氨酸)产生静电排斥,与带正电的氨基酸残基(如精氨酸)产生静电结合。静电作用的大小取决于金属螯合配体和靶分子所带的电荷,两者电荷差异越大,静电作用越强。对于强结合的金属螯合基质材料(如铜离子-亚氨基二乙酸, Cu^{2+} -IDA),金属离子与蛋白质之间的配位作用力远大于静电作用力,以配位作用为主。对弱结合的金属螯合柱,在较低pH值下静电作用对靶分子保留至关重要,随pH值在增加配位作用增强,某些盐(如NaCl)的加入能削弱靶分子与金属螯合配体间的静电作用力^[19]。

1.3 π 键作用

如果蛋白质表面氨基酸侧链带苯环(如苯丙氨酸),苯环上的大 π 键具有供电性,容易受到带正电或带部分正电的亲电介质的攻击,生成 π 络合物^[20]。金属离子带正电,极易与含苯环的氨基酸残基形成 π 络合物,此时完成靶分子的吸附,洗脱时需要竞争性抑制剂的参与,通常在洗脱液中加入一定量的咪唑,咪唑更活跃、容易与亲电试剂结合,因此可以竞争性洗脱靶分子。

1.4 疏水作用

疏水作用是固定相碳链与蛋白质表面疏水区域的亲和作用。在高盐浓度的流动相体系,随着盐浓度的增加,溶液表面张力增大,靶分子与金属螯合柱间的疏水作用增强,此时支配靶分子保留的主要作用力是疏水作用^[21]。而在大多数IMAC体系中盐浓度较低,疏水作用对靶分子保留的影响不大,决定靶分子保留的主要作用力为配位作用和静电作用。

上述几种作用力对靶分子的保留贡献随流动相、固定相和靶分子性质的不同而变化。因此,某种程度上IMAC也可以说是超分子化学作用的结果。由于IMAC涉及金属离子、螯合配体、靶分子(蛋白、多肽等),作用力也根据两两作用分为金属离子的配位键、氢键、 π - π 堆积作用、静电作用、疏水作用等,作用力大小各异,在这些作用力的共同驱动下完成金属离子、螯合配体与靶分子的超分子自组装。因此,可以通过调节溶剂pH值、增加离子强度、添加竞争性抑制剂等多种方式改变IMAC的主导作用力,并据此实现靶分子的有效富集和洗脱。

2 IMAC亲和基质材料

IMAC的核心是金属离子螯合亲和基质材料的制备,主要包括固相载体、络合剂(又称配基)、金属离子3部分。根据材料性质不同又可分为纳米材料、微球色谱基质、棉纤维、分子印迹材料、整体材料、共价有机骨架等。

2.1 IMAC纳米材料

纳米材料一般指结构单元尺寸在1~100 nm的材料,具有比表面积大、小尺寸效应、界面效应、量子效应、量子隧道效应等特征,这些特性赋予纳米材料不同于块状材料的物理性质(如光、热、电等)、化学性质(如吸附、表面活性与催化、分散与团聚等),因此在化工、农业、食品、医药、机械、电子等领域得到了广泛应用^[22]。IMAC纳米材料即是在纳米粒子上固载金属离子形成亲和基质材料,该材料比表面大,可增加固载金属离子的数目,增强结合靶分子的能力,有利于靶分子的有效富集和纯化。

蛋白质翻译后修饰是改变蛋白质细胞活性的主要机制,包括磷酸化、糖基化、乙酰化、甲基化等,其中磷酸化是蛋白质组学最先被研究的主要领域之一^[23]。复杂生物样本中蛋白质酶解产物的磷酸化肽丰度很低,为提高磷酸化肽的有效鉴定,对其进行快速、选择性的富集是磷酸化蛋白质组学研究的挑战。为减少样品的复杂性和离子抑制效应、改善磷酸化多肽的富集特异性和灵敏度,进行更深入、全面的磷酸化蛋白质组学分析,近年来发展了多种IMAC纳米材料用于磷酸化肽的富集。

Dai等^[24]将1,4,7,10-四氮杂环十二烷四乙酸(DOTA)作为螯合配体合成了DOTA包覆的二氧化钛纳米材料并螯合锆离子(TiO_2 @DOTA-Zr)。此材料提供了高特异性的比表面积,增加了固定化 Zr^{4+} 的数目,同时 Zr^{4+} 与DOTA的结合相互作用得以强化,改善了磷酸化多肽的结合能力,减少了非磷酸化多肽的干扰及实验过程中金属离子的损失,实现了脱脂牛奶、人血清等复杂生物样品中磷酸化多肽的选择性富集。

磁性分离技术仅需一外加磁场即可实现靶分子与杂质的有效分离,具有溶剂消耗量少、分离操作简单、成本低、省时省力等优势^[25]。Rashid等^[26]将水杨醛与3-三甲氧基硅烷(APTMS)缩合而成Salen配体,然后螯合 Ni^{2+} ,最后与二氧化硅包覆的锰铁氧体磁性纳米粒子(MNPs)结合形成具有超顺磁性的 MnFe_2O_4 @ SiO_2 @Ni-Salen复合物纳米粒子,其平均直径约70 nm,饱和磁化强度约54 $\text{emu}\cdot\text{g}^{-1}$,每克纳米粒子可有效富集细菌裂解液中的His标签重组蛋白A约(180 \pm 15) mg,整个纯化过程在试管中即可进行,仅需45 min。张维冰等^[27]设计并制备了 Fe^{3+} -有机框架包覆的四氧化三铁磁性纳米颗粒(Fe_3O_4 @MIL-100(Fe))IMAC多孔材料,用于磷酸化多肽的快速富集,材料孔径1.93、3.91 nm,比表面积达168.66 $\text{m}^2\cdot\text{g}^{-1}$,磷酸化多肽富集能力为60 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$,回收率84.47%以上,检测限为0.5 fmol,选择性为 β -casein:BSA=1:500,此方法可有效应用于脱脂牛奶、人血清等复杂样品中痕量磷酸化多肽的选

择性富集。Ma 等^[28]使用乙二醇辅助制备了Ti⁴⁺螯合表面粗糙的聚多巴胺磁性纳米粒子(Ti⁴⁺-rPDA@Fe₃O₄),该材料具有超顺磁性、水分散性好,比表面积为37.7 m²·g⁻¹,饱和磁化强度为38.4 emu·g⁻¹,材料固载Ti元素达到3.93%,对κ-Casein的吸附能力为1105.6 mg·g⁻¹,实现了牛奶中磷酸化蛋白的富集纯化。Piovesana 等^[29]制备了一种新型的Ti⁴⁺螯合聚多巴胺磁性纳米颗粒用于磷酸化多肽的富集,最适上样溶液为1 mol·L⁻¹乙酸溶液,洗脱溶液为0.4 mol·L⁻¹的柠檬酸钠溶液(pH=9),可显著减少非特异性结合,磷酸化多肽的富集选择性和回收率得到明显改善,实现了牛奶中内源磷酸化多肽的富集纯化。

蛋白质的磷酸化分为单磷酸化和多磷酸化,多磷酸化蛋白在真核细胞中是常见的作为信号微调的分子开关^[30]。张丽

华等^[31]制备了镓离子螯合三磷酸腺苷功能化磁性纳米颗粒(Ga³⁺-ATP-MNPs,如图2所示),该材料表面亲水性强,且螯合的镓离子对多磷酸化肽具有较强的选择性(β-casein:BSA=1:5000),此方法处理的样品可直接进行MALDI MS靶上分析,灵敏度达30 amol。该方法从大鼠肝脏线粒体158个磷酸化蛋白中鉴定到193个磷酸化多肽的331个磷酸化位点,所鉴定到的54.4%磷酸化多肽均含有2个以上的磷酸化位点。Gladilovich 等^[32]制备了Fe³⁺-硬脂酸折叠Langmuir-Blodgett膜(FF)和Fe³⁺氧化物纳米粒子(FO)两种材料的固定相用于Hela细胞中磷酸化多肽的富集,同时使用具有不同pH值和电子供体的氨、哌啶、十七氟癸基三乙氧基辛烷磺酸3种洗脱溶剂顺序洗脱,对酸性和多磷酸化的多肽没有歧视,显示了优越的特异性和选择性以及较高的回收率。

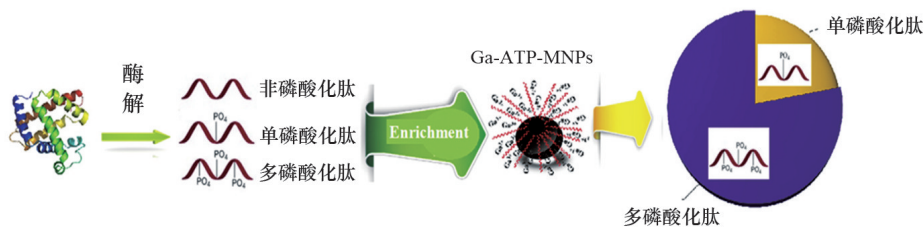


图2 Ga³⁺-ATP-MNPs富集磷酸化肽工作原理示意

Fig. 2 Schematic diagram of the working principle of Ga³⁺-ATP-MNPs for phosphopeptides enrichment

IMAC纳米材料不仅在磷酸化蛋白、多肽等大分子的富集纯化中有较广泛应用,在小分子的选择性富集分离等方面也展示了优良的应用前景。有机磷酸酯杀虫剂(OPPs)在农业中的广泛使用导致其在环境中日益累积,对人类健康与生态平衡带来了严重损害^[33]。封顺等^[34]采用一步化学共沉淀法将镓离子固载在乙二胺四乙酸-四氧化三铁磁性纳米颗粒上,制备了一种新型的纳米复合材料Fe₃O₄-EDTA@Zr(IV)亲和探针。在最优条件下,对杀螟硫磷、杀扑磷、毒死蜱、辛硫磷4种目标OPPs的检测限范围是0.10~10.30 ng·mL⁻¹,相对标准偏差RSDs为0.61%~4.40%(n=3),线性范围跨越3个数量级,相关系数R²>0.9995。

2.2 IMAC微球色谱基质

微米级球状材料展现了作为吸附剂应具备的良好物理化学性质,尤其是其比表面积大、扩散速率高、低毒环保、易化学修饰、制备简便等优点使其可作为IMAC色谱基质用于靶分子的富集、纯化等,同时可作为填料用于色谱柱便于与其它分析方法联用。Sun 等^[35]将铈离子直接固载在聚多巴胺包覆的磁性微球表面,合成了一种新型的核壳结构IMAC微球材料(Fe₃O₄@PD-Nb⁵⁺),具有亲水性高、生物兼容性好、检测限低(2 fmol)、选择性良好(β-casein:BSA=1:500)等优点,显示出较Fe₃O₄@PD-Ti⁴⁺更优的多磷酸化肽选择性,并实现了人血清样本、脱脂牛奶中磷酸化肽的富集。Salimi 等^[36]采用分级模版水解和冷凝方法合成了6 μm的单分散、多孔、磁性二氧化硅微球,通过亚氨基二乙酸功能化制备了Ni²⁺-IMAC

磁性吸附剂,饱和磁性能力为22.1 emu·g⁻¹,较常见的核壳结构磁性吸附剂有更稳定的磁性吸附能力,该材料同时含有介孔和大孔,大孔有利于靶分子的扩散,介孔比表面积大,能够提供靶分子驻留和吸附位点,对Escherichia coli裂解液中His标签绿色荧光蛋白(GFP)的最大吸附量约为87 mg·g⁻¹,纯度大于95%,产率68%。

IMAC亲和基质中金属离子的泄露备受关注,为减少金属离子的泄露,卫引茂等^[37]制备了一种新型的三齿双(5-甲基四唑)胺(BMTA)配体,通过三步反应键合在二氧化硅表面并制备了高效IMAC固定相,对核糖核酸酶A、细胞色素c、溶菌酶3种蛋白的保留时间随流动相pH值的增大逐渐延长,随着竞争剂浓度的增大逐渐减小,保留强度顺序如下:Cu²⁺>Ni²⁺>Zn²⁺。BMTA配体对金属离子的亲和力明显强于传统的IMAC配体IDA,3种金属离子在BMTA配体上的泄露均低于IDA配体。

为进一步减少富集纯化的中间步骤、减少样品损失和污染、提高操作的自动化程度,Britton 等^[38]发展了一种能固载His标签融合蛋白并实现空间分区的连续流涡旋反应装置(VFD),采用IMAC方法在二氧化硅树脂微球上固载了可供定量的His标签蛋白(60 mg·cm⁻²微球固载5~50 μmol·L⁻¹蛋白)。该装置10 min内从细胞裂解液中在线纯化了酯酶、磷酸二酯酶、碱性磷酸酶、增强型绿色荧光蛋白、mCherry红色荧光蛋白、烟草TEAS萜环化酶6种蛋白,均一度约76%,最大均一度大于90%,仅有0.34%的固载蛋白流失。

磷酸糖可调节肿瘤能量代谢,是糖酵解、糖异生、磷酸戊糖途径中一类重要的代谢中间体。由于其在生物样本中浓度低、色谱保留能力弱、易被复杂基质抑制离子化,导致其鉴定较困难。许国旺等^[39]将钛固载在聚多巴胺包覆的二氧化硅微球上,制备了固定相 $\text{SiO}_2@\text{PD-Ti}^{4+}$,如图3所示。吸附在微球表面磷酸糖与3-氨基-9-乙基咪唑(AEC)通过还原胺化反应实现固相衍生化,从而增加其在RPLC上的保留和分辨率,质谱灵敏度提高了3个数量级。固相微球对6-磷酸葡萄糖的吸附能力为 $0.76 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$,远大于商品化的 TiO_2 。此法衍生化时间短($<10 \text{ min}$)、检测限低($38 \text{ pmol}\cdot\text{L}^{-1}$),回收率高($80.6\%\sim 118\%$)、精确度高(RSD 为 $2.8\%\sim 7.8\%$)。

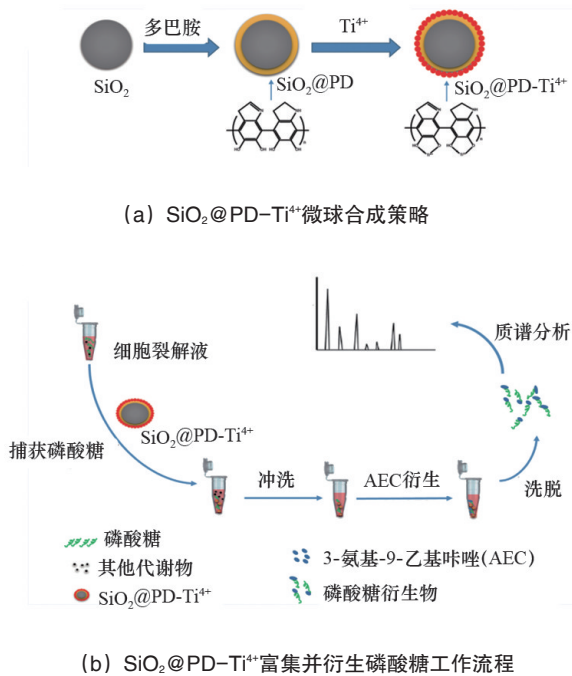


图3 $\text{SiO}_2@\text{PD-Ti}^{4+}$ 富集磷酸糖工作原理示意
Fig. 3 Schematic diagram of the working principle of $\text{SiO}_2@\text{PD-Ti}^{4+}$ for sugar phosphates

除二氧化硅外,琼脂糖凝胶也常用作IMAC微球色谱填料的基质材料。Li等^[40]采用与琼脂糖凝胶Sepharose 6B通过14个原子间隔臂偶联的Cu-IDA亲和配体用于提取纯化海洋细菌中的碱性金属蛋白酶,这种基质的解吸常数 K_d 为 $21.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,理论最大吸收值 Q_{max} 为 $24.9 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。所需要的蛋白酶经一步操作即可得到,纯度可达95%,酶活力可恢复至74.6%,而传统纯化方法步骤多、耗时、产率低,酶活力仅保留8.9%。

马光辉等^[41]将葡聚糖接枝到烯丙基活化的琼脂糖基质上并整合 Ni^{2+} 制备了新型的高容量IMAC基质,其机械强度优于商品化的色谱基质(Ni Sepharose FF),液体流速提升30%。通过精细调节烯丙基的反应程度,可使葡聚糖完全或部分接枝到琼脂糖微球上,葡聚糖在完全接枝的微球中均匀分布,但仅分布在部分接枝的微球外围,部分接枝的螯合基质对

His标签乳酸脱氢酶的结合能力为商品化基质的2.5倍,优于完全接枝螯合基质的结合能力。

Mourão等^[42]使用 Cu^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Co^{2+} 分别螯合羧甲基天冬氨酸(CM-Asp)修饰的琼脂糖凝胶制备了IMAC亲和色谱填料,用于分离木瓜蛋白酶酶解人Ig G的产物(Fab与Fc片段)。在Ig G完全酶解的情况下, Cu^{2+} -CM-Asp琼脂糖基质捕获到的Fab片段为 $2.9 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,不含有Fc片段。 Co^{2+} -CM-Asp琼脂糖基质对Fab的选择性较好,洗脱组分中Fab的含量为 $5.7 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,纯度可达91%。

胞外分泌蛋白N末端的多肽是分泌通路的信号。针对在富集胞外蛋白酶解产物磷酸化多肽时也同时富集得到糖基化多肽的问题,Klement等^[43]制备了 Fe^{3+} -NTA-琼脂糖磁性颗粒,采用优化的缓冲液体系(80%甲醇+0.1%三氟乙酸)可将亲水相互作用降低到最小,能使磷酸化多肽富集的选择性、覆盖率、位点数目提高约50%,而无须提前去除高丰度蛋白。采用两步IMAC富集方法实现了人血清中磷酸化多肽的高选择性富集,可鉴定到 $40 \mu\text{L}$ 人血清酶解产物中约100个磷酸化位点,主要集中在丝氨酸残基上。

典型的富集磷酸化多肽的方法除IMAC外还常用到二氧化钛微球颗粒。Yue等^[44]将这两种方法分别使用多步富集策略从细胞裂解液中提取磷酸化肽。IMAC与 TiO_2 方法可富集到的磷酸化多肽数量相当,富集效率相当,但是IMAC富集的多磷酸化肽所占比例较大且多为碱性、亲水的长链多肽(>20 个氨基酸残基),且两种方法富集的磷酸化多肽的结构域不同,由此可看出IMAC与 TiO_2 两种材料对磷酸化肽的富集效果有互补性,将两种方法联合使用,可以从细胞裂解液中富集到8427个磷酸化多肽,显著提高了鉴定覆盖率。Sun等^[45]建立了 Ga^{3+} -IMAC、 TiO_2 依次顺序洗脱的磷酸化肽定量方法(SIMAC), Ga^{3+} -IMAC灵敏度和选择性均优于其他金属基IMAC。在复杂的基质背景中掺入一系列不同浓度的磷酸化肽标准品混合物用于评价该定量方法的线性及动态范围。结果显示:该方法对大多数磷酸化肽的线性范围和重现性有限,仅可作为复杂基质背景下大规模磷酸化蛋白组学半定量分析方法。

McCarthy等^[46]通过原子转移自由基聚合(atom transfer radical polymerization, ATRP)接枝方法在无孔高分子聚合物微球表面制备了新型含金属离子的纳米粒子IMAC色谱固定相。该固定相亲水层约50 nm,纳米粒子直径约3 nm。此固定相可以分离肌蛋白上铜结合区域的多肽类似物(其中含有的八肽重复单元PHGGGWGQ数目不同),还可以分辨含有相同数目重复单元但亲水性尾巴、Q取代A或酰胺态氮甲基化等不同的多肽。

Ruprecht等^[47]提出了使用Fe-IMAC色谱柱与亲水性的强阴离子色谱柱(hSAX)联用的模式。该模式能够从复杂裂解液中快速、全面、高选择性、高重现性地富集磷酸化多肽,线性范围 $100 \mu\text{g}\sim 5 \text{ mg}$,可鉴定到14000以上的特异性磷酸化肽段,而单纯使用Fe-IMAC仅鉴定到7500个以上的特异性肽

段,对磷酸化肽的结合能力和洗脱效率均优于Ti-IMAC和TiO₂方法。

Zhu等^[48]建立了麦胚凝集素亲和色谱-离子迁移谱-碰撞诱导解离质谱分析平台用于富集糖肽。该方法较传统的亲和色谱简便,无须建立结合、冲洗、洗脱等步骤,共鉴定到鸡卵黏蛋白酶解产物中含27个糖链的117个糖肽。该方法揭示了糖肽高度的位点异质性,鉴定了糖链同分异构体,同时解析了糖肽的带电状态,发现带电量越高越容易被分辨。

2.3 IMAC棉纤维

棉纤维是一种资源丰富的天然材料,其表面有大量的羟基官能团,具有优良的亲水特性,生物兼容性好、机械强度高、稳定性优异,可通过简单的化学处理后作为固定金属离子的优良配体^[49]。冯钰琦等^[50]制备了羧基螯合钛棉纤维(CCC-Ti⁴⁺)填充固相萃取(SPE)柱用于磷酸化多肽的富集,此材料生物兼容性好,对磷酸化多肽的选择性高(β -casein:BSA=1:1000),检测限可达10 fmol,整个富集进程仅3 min,能有效应用于脱脂牛奶、人血清、鼠脑等复杂样品中痕量磷酸化多肽的选择性富集。该课题组还制备了一种新型的固定化镍离子巯基棉纤维(SCF-Ni²⁺)IMAC吸附材料,采用移液器吸头SPE模式对复杂基质中的His标签蛋白进行选择性地富集,整个提取过程可在3 min以内完成、成本低^[51]。最近,该课题组使用乙烯基膦酸作为单体,通过自由基聚合反应合成了一种新型包含磷酸基团的棉纤维材料(CF-NH₂-AZO-p(VPA-x)),该材料可螯合Ti⁴⁺用于磷酸化多肽的选择性富集,当x=2时该材料可展现其最强的选择性、高盐/蛋白抵抗力及提取富集能力,能从鼠脑中提取鉴定到3241种磷酸化多肽^[52]。此外,课题组合成了镍离子-羧基螯合棉纤维(CCC-Ni²⁺),此材料生物兼容性好,其镍离子含量是SCF-Ni²⁺的5倍,Ni²⁺与6×His标签蛋白的亲合力较强,将其制成注射器式填充SPE柱用于大肠杆菌细胞裂解液中标签蛋白(His)和绿色荧光蛋白(GFP)的快速捕获,回收率达89.8%~106.7%,日内RSD<9.4%,日间RSD=10.3%^[53]。

2.4 IMAC分子印迹

分子印迹材料通过与靶分子相互作用形成具有特异性的靶分子专属识别位点,引导靶分子的定向识别,具有选择性强、稳定性好、可再生、低成本等优点^[54]。张丽华等^[55]提出使用His标签抗原决定簇作为高利用率模版制备抗原决定簇导向、表面分子印迹聚合物涂层的纳米粒子,所制备的纳米粒子可对抗原决定簇和靶蛋白特异性识别。首先在Fe₃O₄纳米粒子表面通过溶胶-凝胶法涂布一层二氧化硅,接着修饰IDA基团并螯合Ni²⁺,然后连接His标签抗原决定簇,最后通过多巴胺自聚合制备印记涂层并洗脱His标签抗原决定簇。印记涂层的厚度通过多巴胺的自聚合控制,同时以His标签为锚便于抗原决定簇的固载与去除。随后通过IMAC策略合成了一种分子印迹核壳结构微球(MIP)。首先将猪血清白蛋白(PSA)通过Cu²⁺螯合固载在二氧化硅微球上,接着2-甲基丙烯酸羟乙酯、甲基丙烯酸两种单体混合物通过自由基聚合

反应涂布在微球上,然后去除Cu²⁺和模板得到5 μm直径的MIP,可在核糖核酸酶B、细胞色素c、肌红蛋白等竞争下对PSA进行选择性地识别。此MIP亲水性好,对蛋白的结合能力为8.9 mg·g⁻¹,吸附/解吸平衡可在20 min内建立^[56]。

此外,由于一些非靶标宿主蛋白含有固定的半胱氨酸或富含组氨酸区域或含有金属中心,无法在传统的IMAC纯化中去除。为增强IMAC的选择性,张丽华等^[57]以表面抗原决定簇印记方式发展了一种增强型纯化方法EI-IMAC,使用His标签作为模板,将其印迹到IMAC基质表面,赋予IMAC表面抗原决定簇印记位点,只允许含His标签的蛋白进入印迹位点被IMAC表面的金属离子捕获,此材料印记因子达到7.1,可在15 min内达到吸附平衡。EI-IMAC对细胞粗提液中His标签重组蛋白的选择性得到了明显改善,纯度提高了5%。

2.5 聚多巴胺涂层材料

在弱碱性条件下,多巴胺可在不同基质上自聚合形成聚多巴胺涂层,金属离子可通过多巴胺的儿茶酚羟基固载在聚多巴胺涂层上,因此,多巴胺可作为IMAC的优良配体^[58-59]。邓春晖等^[60]在基质辅助激光解吸离子(MALDI)靶上制备了聚多巴胺螯合Ti⁴⁺涂层(Ti⁴⁺-PDA-plate)用于磷酸化肽的高选择性富集。样品可直接进入基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)分析,减少了样品损失,降低了污染的可能性,缩短了分析时间,增大了分析通量,这种靶上IMAC平台显示了对磷酸化多肽优异的富集选择性和灵敏度。此外,该课题组还使用二步法将钛离子固载在聚多巴胺修饰的移液器吸头上,制备了新型易携带的IMAC材料用于人血清样本中磷酸化肽的快速富集,材料的亲水性和生物兼容性良好、可重复使用、样品和试剂用量少,避免了离心等步骤,明显缩短了分析时间,选择性、稳定性理想^[61]。

石墨烯由含sp²键的平面碳纳米薄片组成,仅有一个原子的厚度,由于其优异的导电性、光学透明性、机械稳定性以及生物兼容性好、承载能力强、大小和形状可控等物化性质,在生物、化学、材料等领域受到越来越广泛地关注^[62-63]。邓春晖等^[64]将锡离子固载在聚多巴胺包覆的磁性石墨烯表面合成了新型IMAC材料(magG@PDA-Sn⁴⁺),该材料具有超顺磁性、良好的亲水性与生物兼容性、比表面积大等优点,实现了人唾液中磷酸化肽的高选择性富集(β -casein:BSA=1:1000),检测灵敏度达0.08 fmol·μL⁻¹。

2.6 IMAC整体材料

由于整体材料具有传质速率快、高渗透性、背压低、制备简便等优点已被广泛应用在色谱分析领域^[65-67],但其作为IMAC基质材料研究较少。Araya-Farias等^[68]制备了一种甲基丙烯酸乙二醇磷酸酯、丙烯酰胺、双丙烯酰胺光聚合整体材料(poly(EGMP-co-AM-co-BAA))微通道玻璃芯片,而后螯合Zr⁴⁺用于磷酸化多肽的在线预浓缩与分离。材料均匀、孔隙较大(0.62 cm³·g⁻¹)、比表面积理想(34.1 m²·g⁻¹),成功实现了不同磷酸化程度及位点的多肽预富集,检测限41 nmol·L⁻¹,

富集倍数在2个数量级以上。叶明亮等^[69]提出了制备包含大孔、介孔和小孔的磷酸功能化分层多孔杂化整体柱(HPHM)的策略,通过聚己内酯(PCL)及低聚倍半硅氧烷乙烯基(vinyl POSS)和乙烯基磷酸(VPA)的共聚合反应使磷酸基团直接引入杂化整体柱,材料的比表面积达 $502 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$,对吡啶-5'-磷酸一水合物的吸附能力为 $63.6 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,对磷酸化多肽的富集特异性优良(β -casein:BSA=1:1000),检测灵敏度达到5 fmol。

2.7 IMAC 共价有机骨架

金属有机骨架(metal organic frameworks, MOFs)是一类由金属离子和有机配体团簇或链组成的杂化结晶多孔材料,其独特的结构和性能使其广泛应用于催化、气体存储和吸附、磁性、成像与药物输送等领域,特别是其特异性的吸附能力与较大的表面积使其能够作为良好的高效分离材料和吸附剂^[70-71]。

钱小红等^[72]针对IMAC材料合成步骤复杂、耗时长的问题,通过缩合与配位化学反应直接将 Ti^{4+} 固载到富含N原子的酮烯胺TpPa-2共价有机骨架中合成了一种新型的IMAC材料(Ti^{4+} -TpPa-2),材料呈规则六角二维层次结构,对 β -casein磷酸化多肽的检测限低至4 fmol,选择性 β -casein:BSA=1:100,同样实现了对 α -casein、脱脂牛奶、Hela细胞裂解物中磷酸化多肽的高灵敏度、高选择性的富集。吴仁安等^[73]在锆-有机骨架($\text{UiO}-66\text{-NH}_2$)上固载锆离子(Zr^{4+})制备了新型的金属亲和探针,包含 $\text{Zr}-\text{O}$ 、 Zr^{4+} 两个金属中心,具有金属氧化物亲合色谱(MOAC)与固定化金属离子亲合色谱(IMAC)两种相互作用,对单磷酸化和多磷酸化多肽均有较高的特异性亲和作用,这种材料称为双金属中心锆-有机骨架(DZMOF)。该探针对于磷酸化多肽的选择性高(β -casein:BSA=1:5000)。

IMAC发展至今已有40多年的历史,其基础及应用研究较成熟,已有多家公司推出了商品化的吸附剂^[74-77]、色谱柱^[78-80]、微量层析柱^[81]、或试剂盒^[82-83],并广泛应用于His标签重组蛋白的快速纯化。

3 结论

由于IMAC富集效率高、消耗成本低、样品回收率高、稳定性好、特异性强等优势,已被广泛应用于质谱等高端仪器前端的样品预处理方法,因此对IMAC材料提出了样品纯化富集倍数高、洗脱后无质谱干扰、选择性强、避免样品非特异性吸附等更高的要求。而不同金属离子与螯合配体、固相基质的多种组合派生了种类多样的IMAC材料,不同的IMAC材料对靶分子的选择性和吸附能力不同,特别是为减少亲和配体与靶分子之间的非特异性吸附,需要考察材料与靶分子的相互作用,若靶分子亲水性强,可采用疏水性的基质材料,若靶分子疏水性强,便采用亲水性的基质材料。

迄今为止,IMAC主要针对单个的酶、蛋白、多肽进行固定或纯化,而两个或两个以上酶、蛋白、多肽的固定化与纯化

研究较少,探讨多种酶、蛋白、多肽的固定化与应用研究可能是未来比较有前景的方向,可进一步提升IMAC在生化反应过程中的功能化模拟与应用。同时,IMAC主要集中于磷酸化肽(蛋白)、糖肽(蛋白)的富集纯化,对于更多具有特殊生理功能的脂类、核酸、特殊功能蛋白应用研究较少,可选取具有重要研究意义的靶分子(如重大疾病生物标志物及其药物靶点等),对其物理化学性质、与金属离子的相互作用进行深入研究,拓展IMAC的应用领域。

针对IMAC在使用多次之后易出现金属离子流失的问题,可以进行灌注再生,但此方法耗时费力、重现性不能保证,因此还需要进一步研究亲和力强的金属离子螯合配体基质材料,减少金属离子的流失,同时还可以考察附加磁场对金属离子保留或流失的影响,以期找到更优的IMAC方式。

参考文献(References)

- [1] Porath J, Carlsson J, Olsson I, et al. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation[J]. *Nature*, 1975, 258(5536): 598-599.
- [2] Lönnnerdal B, Carlsson J, Porath J. Isolation of lactoferrin from human milk by metal-chelate affinity chromatography[J]. *FEBS Letters*, 1977, 75(1): 89-92.
- [3] Edy V G, Billiau A, Somer P D. Purification of human fibroblast interferon by zinc chelate affinity chromatography[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1977, 252(17): 5934-5935.
- [4] Porath J, Olin B. Immobilized metal ion affinity adsorption and immobilized metal ion affinity chromatography of biomaterials. Serum protein affinities for gel-immobilized iron and nickel ions[J]. *Biochemistry*, 1983, 22(7): 1621-1630.
- [5] Andersson L. Fractionation of human serum proteins by immobilized metal affinity chromatography[J]. *Journal of Chromatography*, 1984, 315(12): 167-174.
- [6] Ramadan N, Porath J. Fe^{3+} -Hydroxamate as immobilized metal affinity-adsorbent for protein chromatography[J]. *Journal of Chromatography*, 1985, 321(1): 93-104.
- [7] Andersson L, Porath J. Isolation of phosphoproteins by immobilized metal (Fe^{3+}) affinity chromatography[J]. *Analytical Biochemistry*, 1986, 154(1): 250-254.
- [8] Muszyńska G, Andersson L, Porath J. Selective adsorption of phosphoproteins on gel-immobilized ferric chelate[J]. *Biochemistry*, 1986, 25(22): 6850-6853.
- [9] Figueroa A, Corradini C, Feibush B, et al. High-performance immobilized-metal affinity chromatography of proteins on iminodiacetic acid silica-based bonded phases[J]. *Journal of Chromatography*, 1986, 371(371): 335-352.
- [10] Andersson L, Sulkowski E, Porath J. Facile resolution of α -fetoproteins and serum albumins by immobilized metal affinity chromatography[J]. *Cancer Research*, 1987, 47(14): 3624-3626.
- [11] Hemdan E S, Zhao Y J, Sulkowski E, et al. Surface topography of histidine residues: A facile probe by immobilized metal ion affinity chromatography[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1989, 86(6): 1811-1815.
- [12] Schunter A J, Yue X, Hummon A B. Phosphoproteomics of colon can-

- cer metastasis: Comparative mass spectrometric analysis of the isogenic primary and metastatic cell lines SW480 and SW620[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2017, 409(7): 1749-1763.
- [13] He Z, Tan J S, Lai O M, et al. Optimization of conditions for the single step IMAC purification of miraculin from *Synsepalum dulcificum* [J]. *Food Chemistry*, 2015, 181: 19-24.
- [14] Kennedy J J, Yan P, Zhao L, et al. Immobilized metal affinity chromatography coupled to multiple reaction monitoring enables reproducible quantification of phospho-signaling[J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2016, 15(2): 726-739.
- [15] Kowalska E, Bartnicki F, Pels K, et al. The impact of immobilized metal affinity chromatography (IMAC) resins on DNA aptamer selection[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2014, 406(22): 5495-5499.
- [16] 杨柳. 钴螯合亲和介质的制备及其在六聚组氨酸融合蛋白纯化中的应用[D]. 西安: 西北大学, 2008.
Yang Liu. Preparation of cobalt chelate affinity mediums and their application in purification of 6×His-tagged proteins[D]. Xi'an: Northwest University, 2008.
- [17] Vijayalakshmi M A. Pseudobiospecific ligand affinity chromatography [J]. *Trends in Biotechnology*, 1989, 7(3): 71-76.
- [18] 文禹颀, 邹少兰, 林东强, 等. 双水相亲和萃取法从豆壳中分离过氧化物酶[J]. *食品科学*, 2004, 25(7): 93-96.
Wen Yuxie, Zou Shaolan, Lin Dongqiang, et al. Affinity partition of soybean hull peroxidase in aqueous two-phase systems[J]. *Food Science*, 2004, 25(7): 93-96.
- [19] Anspach F B. Silica-based metal chelate affinity sorbents. I. Preparation and characterization of iminodiacetic acid affinity sorbents prepared via different immobilization techniques[J]. *Journal of Chromatography A*, 1994, 672: 35-49.
- [20] 李蓉, 邸泽梅, 陈国亮. 金属螯合亲和和色谱中固定金属与蛋白质的作用[J]. *分析化学*, 2002, 30(5): 552-555.
Li Rong, Di Zemei, Chen Guoliang. Interaction between immobilized metal and protein in metal chelate affinity chromatography[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2002, 30(5): 552-555.
- [21] 李蓉, 陈国亮, 赵文明. 固定金属离子亲和色谱-蛋白质分离方法、原理和应用[J]. *化学通报*, 2005, 68(5): 352-360.
Li Rong, Chen Guoliang, Zhao Wenming. Immobilized metal ion affinity chromatography-- methods, principles, characteristics and applications for protein separation[J]. *Chemistry Bulletin*, 2005, 68(5): 352-360.
- [22] 白春礼. 纳米科技及其发展前景[J]. *科学通报*, 2001, 46: 89-92.
Bai Chunli. Nanometer science and technology and its development prospect[J]. *Science Bulletin*. 2001, 46: 89-92.
- [23] Bond A E, Row P E, Dudley E. Post-translation modification of proteins; methodologies and applications in plant sciences[J]. *Phytochemistry*, 2011, 72(10): 975-996.
- [24] Dai J, Wang M, Liu H. Highly selective enrichment of phosphopeptides using Zr⁴⁺-immobilized Titania nanoparticles[J]. *Talanta*, 2017, 164: 222-227.
- [25] Harivardhan R L, Arias J L, Julien N, et al. Magnetic nanoparticles: Design and characterization, toxicity and biocompatibility, pharmaceutical and biomedical applications[J]. *Chemical Reviews*, 2012, 112(11): 5818-5878.
- [26] Rashid Z, Ghahremanzadeh R, Nejadmoghadam M R, et al. Nickel-salen supported paramagnetic nanoparticles for 6-His-target recombinant protein affinity purification[J]. *Journal of Chromatography A*, 2017, 1490: 47-53.
- [27] Chen Y, Xiong Z, Peng L, et al. Facile preparation of core-shell magnetic metal-organic framework nanoparticles for the selective capture of phosphopeptides[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2015, 7(30): 16338-16347.
- [28] Ma X, Ding C, Yao X, et al. Ethylene glycol assisted preparation of Ti⁴⁺-modified polydopamine coated magnetic particles with rough surface for capture of phosphorylated proteins[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2016, 929: 23-30.
- [29] Piovesana S, Capriotti A L, Cavaliere C, et al. Phosphopeptide enrichment: Development of magnetic solid phase extraction method based on polydopamine coating and Ti⁴⁺-IMAC[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2016, 909: 67-74.
- [30] Ge R, Shan W. Bacterial phosphoproteomic analysis reveals the correlation between protein phosphorylation and bacterial pathogenicity[J]. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 2011, 9(4/5): 119-127.
- [31] Zhang L, Liang Z, Zhang L, et al. Facile synthesis of gallium ions immobilized and adenosine functionalized magnetic nanoparticles with high selectivity for multi-phosphopeptides[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2015, 900: 46-55.
- [32] Gladilovich V, Greifenhagen U, Sukhodolov N, et al. Immobilized metal affinity chromatography on collapsed Langmuir-Blodgett iron (III) stearate films and iron(III) oxide nanoparticles for bottom-up phosphoproteomics[J]. *Journal of Chromatography A*, 2016, 1443: 181-190.
- [33] Songa E A, Okonkwo J O. Recent approaches to improving selectivity and sensitivity of enzyme-based biosensors for organophosphorus pesticides: A review[J]. *Talanta*, 2016, 155: 289-304.
- [34] Jiang L, Huang T, Feng S, et al. Zirconium(IV) functionalized magnetic nanocomposites for extraction of organophosphorus pesticides from environmental water samples[J]. *Journal of Chromatography A*, 2016, 1456: 49-57.
- [35] Sun X, Liu X, Feng J, et al. Hydrophilic Nb⁵⁺-immobilized magnetic core-shell microsphere-A novel immobilized metal ion affinity chromatography material for highly selective enrichment of phosphopeptides[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2015, 880: 67-76.
- [36] Salimi K, Usta D D, Koçer İ, et al. Highly selective magnetic affinity purification of histidine-tagged proteins by Ni²⁺ carrying monodisperse composite microspheres[J]. *RSC Advances*, 2017, 7(14): 8718-8726.
- [37] Bo C, Wang C, Wei Y. Novel bis(5-methyltetrazolium)amine ligand-bonded stationary phase with reduced leakage of metal ions in immobilized metal affinity chromatography of proteins[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2016, 408(27): 7595-7605.
- [38] Britton J, Dyer R P, Majumdar S, et al. Ten-minute protein purification and surface tethering for continuous-flow biocatalysis[J]. *Angewandte Chemie International*, 2017, 56(9): 1-6.
- [39] Qin Q, Wang B, Chang M, et al. Highly efficient solid-phase derivatization of sugar phosphates with titanium-immobilized hydrophilic polydopamine-coated silica[J]. *Journal of Chromatography A*, 2016, 1457: 125-133.
- [40] Li S, Wang L, Yang J, et al. Affinity purification of metalloprotease from marine bacterium using immobilized metal affinity chromatography[J]. *Journal of Separation Science*, 2016, 39(11): 2050-2056.
- [41] Zhao L, Zhang J, Huang Y, et al. Efficient fabrication of high-capacity immobilized metal ion affinity chromatographic media: The role of the dextran-grafting process and its manipulation[J]. *Journal of Separation Science*, 2017, 40(1): 1-10.

- tion Science, 2016, 39(6): 1130–1136.
- [42] Mourão C A, Carmignotto G P, Bueno S M A. Separation of human IgG fragments using copper, nickel, zinc, and cobalt chelated to CM-Asp-agarose by positive and negative chromatography[J]. *Journal of Chromatography B*, 2016, (1017/1018): 163–173.
- [43] Klement E, Raffai T, Medzihradsky K F. Immobilized metal affinity chromatography optimized for the analysis of extracellular phosphorylation[J]. *Proteomics*, 2016, 16(13): 1858–1862.
- [44] Yue X, Schunter A, Hummon A B. Comparing multi-step IMAC and multi-step TiO₂ methods for phosphopeptide enrichment[J]. *Analytical Chemistry*, 2015, 87(17): 8837–8844.
- [45] Sun Z Y, Hamilton K L, Reardon K F. Evaluation of quantitative performance of sequential immobilized metal affinity chromatographic enrichment for phosphopeptides[J]. *Analytical Biochemistry*, 2014, 445(1): 30–37.
- [46] McCarthy P, Chattopadhyay M, Millhauser G L, et al. Nanoengineered analytical immobilized metal affinity chromatography stationary phase by atom transfer radical polymerization: Separation of synthetic prion peptides[J]. *Analytical Biochemistry*, 2007, 366(1): 1–8.
- [47] Ruprecht B, Koch H, Medard G, et al. Comprehensive and reproducible phosphopeptide enrichment using iron immobilized metal ion affinity chromatography (Fe-IMAC) columns[J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2015, 14(1): 205–215.
- [48] Zhu F F, Trinidad J C, Clemmer D E. Glycopeptide site heterogeneity and structural diversity determined by combined lectin affinity chromatography/IMS/CID/MS techniques[J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2015, 26(7): 1092–1102.
- [49] He X M, Zhu G T, Zhu Y Y, et al. Facile preparation of biocompatible sulfhydryl cotton fiber-based sorbents by "Thiol-ene" click chemistry for biological analysis[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2014, 6(20): 17857–17864.
- [50] He X M, Chen X, Zhu G T, et al. Hydrophilic carboxyl cotton chelator for titanium(IV) immobilization and its application as novel fibrous sorbent for rapid enrichment of phosphopeptides[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2015, 7(31): 17356–17362.
- [51] He X M, Zhu G T, Lu W, et al. Nickel(II)-immobilized sulfhydryl cotton fiber for selective binding and rapid separation of histidine-tagged proteins[J]. *Journal of Chromatography A*, 2015, 1405: 188–192.
- [52] He X M, Chen X, Yuan B F, et al. Graft modification of cotton with phosphate group and its application to the enrichment of phosphopeptides[J]. *Journal of Chromatography A*, 2017, 1484: 49–57.
- [53] He X M, Yuan B F, Feng Y Q. Facial synthesis of nickel(II)-immobilized carboxyl cotton chelator for purification of histidine-tagged proteins[J]. *Journal of Chromatography B*, 2017, 1043: 122–127.
- [54] Yang K, Zhang L, Liang Z, et al. Protein-imprinted materials: Rational design, application and challenges. Protein-imprinted materials: Rational design, application and challenges[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2012, 403(8): 2173–2183.
- [55] Li S, Yang K, Liu J, et al. Surface-imprinted nanoparticles prepared with a his-tag-anchored epitope as the template[J]. *Analytical Chemistry*, 2015, 87(9): 4617–4620.
- [56] Li Q, Yang K, Li S, et al. Preparation of surface imprinted core-shell particles via a metal chelating strategy: specific recognition of porcine serum albumin[J]. *Microchimica Acta*, 2016, 183(1): 345–352.
- [57] Li S, Yang K, Zhao B, et al. Epitope imprinting enhanced IMAC (EI-IMAC) for highly selective purification of His-tagged protein[J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2016, 4(11): 1960–1967.
- [58] Ye Q, Zhou F, Liu W. Bioinspired catecholic chemistry for surface modification[J]. *Chemical Society Reviews*, 2011, 40: 4244–4258.
- [59] Yang Y, Zheng Z, Deng C, et al. Hydrophilic polydopamine-coated graphene for metal ion immobilization as a novel immobilized metal ion affinity chromatography platform for phosphoproteome analysis[J]. *Analytical Chemistry*, 2013, 85(18): 8483–8487.
- [60] Shi C, Lin Q, Deng C. Preparation of on-plate immobilized metal ion affinity chromatography platform via dopamine chemistry for highly selective isolation of phosphopeptides with matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry analysis[J]. *Talanta*, 2015, 135: 81–86.
- [61] Shi C, Deng C. Immobilized metal ion affinity chromatography ZipTip pipette tip with polydopamine modification and Ti⁴⁺ immobilization for selective enrichment and isolation of phosphopeptides[J]. *Talanta*, 2015, 143: 464–468.
- [62] Jiang B, Wu Q, Deng N, et al. Hydrophilic GO/Fe₃O₄/Au/PEG nanocomposites for highly selective enrichment of glycopeptides[J]. *Nanoscale*, 2016, 8(9): 4894–4897.
- [63] Zhang Q, Zhang Q, Xiong Z, et al. Facile preparation of mesoporous carbon-silica-coated graphene for the selective enrichment of endogenous peptides[J]. *Talanta*, 2016, 146: 272–278.
- [64] Lin H, Deng C. Development of immobilized Sn⁴⁺ affinity chromatography material for highly selective enrichment of phosphopeptides[J]. *Proteomics*, 2016, 16(21): 2733–2741.
- [65] Han B, Zhao C, Yin J, et al. High performance aptamer affinity chromatography for single-step selective extraction and screening of basic protein lysozyme[J]. *Journal of Chromatography B*, 2012, 903(903): 112–117.
- [66] Han B, Wang P, Zhu G, et al. Microchip free flow isoelectric focusing for protein prefractionation using monolith with immobilized pH gradient[J]. *Journal of Separation Science*, 2009, 32(8): 1211–1215.
- [67] Wu C, Liang Y, Yang K, et al. Clickable periodic mesoporous organosilica monolith for highly efficient capillary chromatographic separation [J]. *Analytical Chemistry*, 2016, 88(3): 1521–1525.
- [68] Araya-Farias M, Dziomba S, Carbonnier B, et al. A lab-on-a-chip for monolith-based preconcentration and electrophoresis separation of phosphopeptides[J]. *Analyst*, 2017, 142(3): 485–494.
- [69] Zhang H, Ou J, Yao Y, et al. Facile preparation of titanium(IV)-immobilized hierarchically porous hybrid monoliths[J]. *Analytical Chemistry*, 2017, 89(8): 4655–4662.
- [70] Li Y, Bao T, Chen Z. Polydopamine-assisted immobilization of zeolitic imidazolate framework-8 for open-tubular capillary electrochromatography[J]. *Journal of Separation Science*, 2017, 40(4): 954–961.
- [71] Manna K, Zhang T, Lin W. ChemInform abstract: Postsynthetic metalation of bipyridyl-containing metal-organic frameworks for highly efficient catalytic organic transformations[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2014, 136(18): 6566–6569.
- [72] Wang H, Jiao F, Gao F, et al. Titanium (IV) ion-modified covalent organic frameworks for specific enrichment of phosphopeptides[J]. *Talanta*, 2017, 166: 133–140.
- [73] Peng J, Zhang H, Li X, et al. Dual-metal centered zirconium-organic framework: A metal-affinity probe for highly specific interaction with phosphopeptides[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2016, 8(51): 35012–35020.
- [74] Karakus C, Uslu M, Yazici D, et al. Evaluation of immobilized metal

- affinity chromatography kits for the purification of histidine-tagged recombinant CagA protein[J]. *Journal of Chromatography B*, 2016, 1021: 182-187.
- [75] Ding S J, Wang Y C, Jacobs J M, et al. Quantitative phosphoproteome analysis of lysophosphatidic acid induced chemotaxis applying dual-step 18O labeling coupled with immobilized metal-ion affinity chromatography[J]. *Journal of Proteome Research*, 2008, 7(10): 4215-4224.
- [76] Jiang C P, Wdchuck J B, Goins W F, et al. Immobilized cobalt affinity chromatography provides a novel, efficient method for herpes simplex virus type 1 gene vector purification[J]. *Journal of Virology*, 2004, 78(17): 8994-9006.
- [77] Kanakaraj I, Jewell D L, Murphy J C, et al. Removal of PCR error products and unincorporated primers by metal-chelate affinity chromatography[J]. *PLoS One*, 2011, 6(1): e14512.
- [78] Ortiz-Martin L, Benavente F, Medina-Casanellas S, et al. Study of immobilized metal affinity chromatography sorbents for the analysis of peptides by on-line solid-phase extraction capillary electrophoresis-mass spectrometry[J]. *Electrophoresis*, 2015, 36(6): 962-970.
- [79] Robichon C, Luo J Y, Causey T B, et al. Engineering *Escherichia coli* BL21 (DE3) derivative strains to minimize *E. coli* protein contamination after purification by immobilized metal affinity chromatography[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(13): 4634-4646.
- [80] Kaur J, Reinhardt D P. Immobilized metal affinity chromatography copurifies TGF- α 1 with histidine-tagged recombinant extracellular proteins[J]. *PLoS One*, 2012, 7(10): e48629.
- [81] Ham B M, Jacob J T, Cole R B. MALDI-TOF MS of phosphorylated lipids in biological fluids using immobilized metal affinity chromatography and a solid ionic crystal matrix[J]. *Analytical Chemistry*, 2005, 77(14): 4439-4447.
- [82] Abelin J G, Trantham P D, Penny S A, et al. Complementary IMAC enrichment methods for HLA-associated phosphopeptide identification by mass spectrometry[J]. *Nature Protocols*, 2015, 10(9): 1308-1318.
- [83] Ye K M, Jin S, Atai M M, et al. Tagging retrovirus vectors with a metal binding peptide and one-step purification by immobilized metal affinity chromatography[J]. *Journal of Virology*, 2004, 78(18): 9820-9827.

Recent advances in immobilized metal ion affinity chromatography

HAN Bin

Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China

Abstract The immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC) is based on the affinity between the transition metal ions and the target molecules, with the transition metal ions being immobilized on the solid matrix by ligands and combined with histidine or cysteine of the target molecules to form relatively stable complexes. The enrichment and the purification of the target molecules are achieved by the competitive elution. The IMAC, with the preparation of the metal chelate affinity materials as its core technology, has been developed for more than 40 years and widely used in the specific enrichment, separation and purification of the target molecules due to its high affinity selectivity, good biocompatibility and reversible regeneration. From the point of view of the analytical chemistry, the recent three-year advances in the IMAC nanomaterials, microsphere chromatography matrices, cotton fibers, molecularly imprinted materials, monolith and covalent organic frameworks are reviewed in this paper.

Keywords immobilized metal ion affinity chromatography; enrichment; purification; material

(责任编辑 田恬)