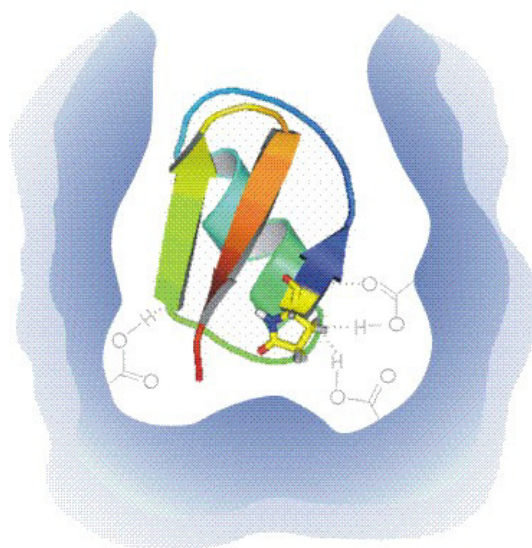


# Funktionalisering av sensorytor med molekylära avtryck - MIP

Inga Gustafson



TOTALFÖRSVARETS FORSKNING SINSTITUT

NBC-skydd  
901 82 Umeå

FOI-R--1621--SE

April 2005

ISSN 1650-1942

**Vetenskaplig rapport**

# Funktionalisering av sensorytor med molekylära avtryck - MIP

Inga Gustafson



<b>Utgivare</b> Totalförsvarets Forskningsinstitut - FOI NBC-skydd 901 82 Umeå	<b>Rapportnummer, ISRN</b> FOI-R--1621--SE	<b>Klassificering</b> Vetenskaplig rapport
	<b>Forskningsområde</b> 3. Skydd mot NBC och andra farliga ämnen	
	<b>Månad, år</b> April 2005	<b>Projektnummer</b> A4241
	<b>Delområde</b> 32 B- och C-forskning	
	<b>Delområde 2</b>	
<b>Författare/redaktör</b> Inga Gustafson	<b>Projektledare</b> Torbjörn Tjärnhage	
	<b>Godkänd av</b>	
	<b>Uppdragsgivare/kundbeteckning</b> Fö	
	<b>Tekniskt och/eller vetenskapligt ansvarig</b>	
<b>Rapportens titel</b> Funktionalisering av sensorytor med molekylära avtryck - MIP		
<b>Sammanfattning (högst 200 ord)</b> <p>Det finns ett stort behov av att utveckla realtidsinstrument för detektion av bakterier, virus och toxiner. De flesta metoder som är framtagna för detektion av dessa ämnen baseras på antikroppar och andra biologiska molekyler som bindande element. Dessa har sina inneboende svagheter i en begränsad stabilitet. I sökandet efter alternativa bindande molekyler har molekylära avtryck (Molecularly Imprinted Polymers, MIP) uppmärksammats. Framställningen av MIP baseras på att specifika avtryck av det ämne som ska detekteras formas i en syntetisk polymer. Detta kan resultera i bindningstillfällen med liknade affinitet och specificitet som hos naturliga receptorer men med en betydligt bättre stabilitet.</p> <p>Molekylära avtryck har använts inom t.ex. affinitetskromatografi för separation av små oorganiska molekyler. Men på 80-talet initierades strävanden att även använda MIP-teknologin för att tillverka syntetiska receptorer och utvecklingen går nu mot att framställa MIP för större biologiska substanser på sensorytor. En sensor baserad på MIP-teknologi skulle kunna ha hög stabilitet och vara lätt att producera till en låg kostnad.</p> <p>Den här rapporten ger en överblick över metoder för att framställa och karakterisera MIP. Med utgångspunkt från några exempel diskuteras även möjligheterna att använda MIP i sensorer.</p>		
<b>Nyckelord</b> Molekylära avtryck, polymerer, sensorer		
<b>Övriga bibliografiska uppgifter</b>	<b>Språk</b> Svenska	
<b>ISSN</b> 1650-1942	<b>Antal sidor:</b> 54 s.	
<b>Distribution enligt missiv</b>	<b>Pris:</b> Enligt prislista	

<b>Issuing organization</b> FOI – Swedish Defence Research Agency NBC Defence SE-901 82 Umeå	<b>Report number, ISRN</b> FOI-R--1621--SE	<b>Report type</b> Scientific report
	<b>Programme Areas</b> 3. NBC Defence and other hazardous substances	
	<b>Month year</b> April 2005	<b>Project No.</b> A4241
	<b>Subcategories</b> 32 Biological and Chemical Defence Research	
	<b>Subcategories 2</b>	
<b>Author/s (editor/s)</b> Inga Gustafson	<b>Project manager</b> Torbjörn Tjärnhage	
	<b>Approved by</b>	
	<b>Sponsoring agency</b>	
	<b>Scientifically and technically responsible</b>	
<b>Report title (In translation)</b> Modification of sensor surfaces with molecularly imprinted polymers - MIP		
<b>Abstract (not more than 200 words)</b> <p>There is a great need of equipments for real time detection of bacteria, virus and toxins. Existing sensors used for biological detection are often based on natural molecules such as antibodies. Unfortunately, the stability of these molecules is relatively low and major efforts have been made to develop alternative receptor molecules. A promising method is the formation of molecularly imprinted polymers (MIP). This method is based on the formation of specific recognition sites in synthetic polymers, using imprint molecules, which can result in binding sites with similar affinities and selectivity as natural receptors.</p> <p>The technique has previously been applied to a variety of small inorganic molecules and used in chromatography. The new challenge is to produce imprints of macromolecules such as protein and bacteria and immobilize these at a sensor surface. The interest of MIP as recognition material in sensors resides in the expected high stability of these receptors and their expected low production costs.</p> <p>The report reviews methods to produce and characterize MIP. Using some examples, it also discusses the potential of MIP in sensor applications.</p>		
<b>Keywords</b> Molecularly imprinted polymers, sensors		
<b>Further bibliographic information</b>	<b>Language</b> Swedish	
<b>ISSN</b> 1650-1942	<b>Pages</b> 54 p.	
	<b>Price acc. to pricelist</b>	

## Innehåll

<b>1</b>	<b>Förkortningar .....</b>	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>Inledning.....</b>	<b>9</b>
<b>3</b>	<b>Molekylära avtryck, MIP .....</b>	<b>11</b>
<b>4</b>	<b>Polymera avtryck som efterliknar naturliga bindningsställen.....</b>	<b>15</b>
<b>5</b>	<b>Metodik för tillverkning av MIP .....</b>	<b>17</b>
	5.1 Lösningsmedlets effekt.....	17
	5.2 Funktionella monomerer.....	18
	5.3 Tvärbindande monomerer, ”crosslinkers” .....	20
	5.4 Initiering av polymeriseringen .....	21
	5.5 Molekulära avtryck tillverkade utifrån epitop .....	21
	5.6 MIP baserade på metallkoordinering .....	22
	5.7 Datoroptimering av molekylära avtryck .....	22
<b>6</b>	<b>Format på MIP .....</b>	<b>25</b>
	6.1 MIP-partiklar.....	25
	6.2 MIP-filmer .....	26
<b>7</b>	<b>Metoder för karakterisering av MIP .....</b>	<b>31</b>
	7.1 Kemiska metoder .....	31
	7.2 Strukturella metoder .....	31
	7.3 Biofysikaliska metoder .....	32
<b>8</b>	<b>Signalöverföring .....</b>	<b>35</b>
<b>9</b>	<b>Sensorer baserade på MIP .....</b>	<b>39</b>
<b>10</b>	<b>Summering och diskussion .....</b>	<b>43</b>

**Appendix 1.** Exempel där MIP-filmer immobiliserade på sensorytor använts för detektion av oorganiska ämnen.

**Appendix 2.** Exempel där MIP-filmer immobiliserade på sensorytor använts för detektion av biologiska ämnen.

**Appendix 3.** Exempel på patent som inkluderar MIP och sensorapplikationer.



## 1 Förkortningar

ABDV	Azobis(2,4-dimethylvaleronitrile)
AMP	Adenosine 5'-monophosphate
AMPSA	Acrylamido-2-methylpropane sulfonic acid
AIBN	Azo-bis(isobutyronitrile)
$\alpha$	Separationsfaktor
BAW	Bulk acoustic wave
CMP	Cytosine 5'-monophosphate
CV	Cyklisk voltometri
DVB	Divinylbenzene
EGDMA	Ethylene glycol dimethacrylate
FTIR	Fourier-transform infrared spectroscopy
GMP	Guanosine 5'-monophosphate
HEMA	2-Hydroxyethyl methacrylate
ISFET	Ion-sensitive field-effect transistor
$k'$	Kapacitetfaktor
MAA	Methacrylic acid trimethacrylate
MDA	N,N-Methylenediacrylamide
OUA	Oligourethane acrylate
PVC	Poly(vinyl chloride)
PQC	Piezoelectric quartz crystal
QCM	Quartz crystal microbalance
RfS	Reflectometric interference spectroscopy
SPR	Surface plasmon resonance
TE	Titanium <sup>IV</sup> ethylate
TEDMA	Tri(ethylene glycol)dimethacrylate
TEOS	Tetraethoxysilane
TMB	Tetramethylbenzidine
TRIM	Trimethylolpropane
UAEE	Imidazole-4-acrylic acid ethyl ester





## 2 Inledning

Det finns idag inga möjligheter att i realtid specifikt detektera biologiska stridsmedel/toxiner. Utvecklingen av instrument för detektion av B-stridsmedel och toxiner ligger efter i jämförelse med den utveckling som skett inom området för detektion av nukleära och kemiska stridsmedel. För detektion av bakterier och toxiner i realtid införskaffar försvarsmakten nu ett trigger/varningsinstrument, en så kallad FLAPS.<sup>1</sup> Detta instrument indikerar en förhöjd halt av biologiska ämnen i luften, men inte vad dessa ämnen är. Metoden baseras på laserfluorescens med vilken det är möjligt att särskilja partiklar med biologiskt ursprung från partiklar som inte är det.

Krav som ställs på realtidsinstrument för detektion av biologiska stridsmedel och toxiner är att de ska ha hög specificitet och hög känslighet. Andra krav är t.ex. att de ska vara stabila och fältanpassade samt att tillverkningskostnaden skall vara låg. De flesta av de kommersiellt tillgängliga instrumenten för detektion eller identifiering av biologiska stridsmedel baseras på antingen genetiska (PCR) eller immunologiska (antikroppar) metoder. Båda dessa metoder involverar provbearbetning som t.ex. tillsats av reagensmedium och inmärkningsmolekyler vilket gör att detektionen inte kan ske i realtid. Ett ytterligare problem med immunologiska metoderna är antikroppars låga stabilitet, d.v.s. antikroppar kan lätt förlora sin aktivitet vid lagring och/eller användning. Det pågår idag intensiv forskning för att ta fram alternativa igenkänningsmolekyler och det naturliga kravet på dessa är hög affinitet, selektivitet och stabilitet.

Den här rapporten handlar om molekylära avtryck, Molecularly Imprinted Polymers (MIP, i rapporten används MIP som förkortning för molekylära avtryck)<sup>2, 3</sup> som vi bedömt kan leda till en intressant teknologikutveckling inom sensorområdet. Rapporten ger en introduktion till teknologin och den fokuseras på möjligheterna att använda MIP som syntetiska receptorer i sensorapplikationer.

Först något kort om utvecklingen inom två alternativa områden. Den ena utvecklingslinjen är baserad på genetiska metoder och det andra utgår från organiska synteser. Genetiska metoder har använts för att stabilisera proteiners struktur, öka bindningsegenskaperna eller för att skapa nya funktioner i dessa molekyler. Exempel på sådana modifieringar är antikroppar som endast består av det antigenbindande fragmentet (Fab, fragment antigen binding), av en bindande kedja av fragmentet (scFv, single chain fragment variable) eller där antikroppfragmentens affinitet för liganden förändrats.<sup>4, 5</sup>

---

<sup>1</sup> Wästerby, P. Gustafson, I., Tjärnhage, T. *Instrument för indikering av biologiska aerosoler*. FOI R--1096--SE ISSN 1650-1942 (2003).

<sup>2</sup> Haupt, K., Mosbach, K. *Molecularly Imprinted Polymers and Their Use in Biomimetic Sensors*. Chem Rev, 100, 2495-2504 (2000).

<sup>3</sup> Ye, L., Haupt, K. *Molecularly imprinted polymers as antibody and receptor mimics for assays, sensors and drug discovery*. Anal Bioanal Chem, 378, 1887-1897 (2004).

<sup>4</sup> Hock, B., Seifert, M., Kramer, K. *Engineering receptors and antibodies for biosensors*. Biosens Bioelectron, 17, 239-249 (2002).

<sup>5</sup> Pini, A., Bracci, L. *Phage Display of Antibody Fragments*. Curr Protein Peptide Sci, 155-169 (2000).

Genetiska metoder har också använts för att ta fram s.k. ”affibodies”.<sup>6</sup> Detta är ett litet och robust protein som specifikt kan binda till andra proteiner. Metoden baseras på att ett antal aminosyror slumpmässigt byts ut så att varje ”affibodie” får specifika bindningsegenskaper. Liknande metoder har även används för att framställa aptamerer som med hög specificitet kan binda till flera olika ämnen. Aptamerer är artificiella enkelsträngade oligonukleotider av DNA eller RNA. Utifrån sekvensen hos oligonukleotiden bildas unika tredimensionella strukturer som med hög affinitet och specificitet kan binda till målsubstansen.<sup>7,8</sup>

De metoder som beskrivs ovan kan öka stabiliteten hos igenkänningsmolekylerna och göra dessa klart bättre än vanliga antikroppar. Men den kemiska och fysiska stabiliteten hos biomolekyler såsom proteiner och nukleotider är svår att förändra. Också de modifierade biologiska molekyler kommer om de utsätts för extrema förhållanden såsom strålning, olika temperaturförhållanden eller sura och basiska lösningar att degenerera relativt snabbt. Ett krav på instrumenten är att regenereringen av sensorytan ska kunna ske under biologiskt ogynnsamma förhållanden utan att igenkänningsmolekylerna förändras.

Den andra utvecklingslinjen är att överföra igenkänningsmekanismerna i biologiska system till kemiskt syntetiserade makromolekyler som kan efterlikna naturliga biologiska receptorer med avseende på affinitet och selektivitet. De kemiskt syntetiserade makromolekylerna kan vara uppbyggda av lågmolekylära ringar eller organiska grupper som bildar specifika strukturer med klyftor och hålrum till vilka olika ämnen kan binda. Exempel på sådana syntetiska bindningsställen är dendrimerer vilka har en trädliknande starkt förgrenad struktur<sup>9</sup> och calixarener där t.ex. porfyrin eller kolhydrat grupper är bundna till ett antal aromatringer, vanligtvis 4, som bildar en skålformad struktur.<sup>10</sup>

Ett av de mer lovande alternativen inom den andra kategorin har vi bestämt vara MIP. Därav denna studie.

---

<sup>6</sup> Wahlberg, E., Lendel, C., Helgstrand, M., Allard, P., Dincbas-Renqvist, V., Hedqvist, A., Berglund, H., Nygren, P.-Å., Härd, T. *An affibody in complex with a target protein: Structure and coupled folding*. Biophysics, 100 (6), 3185-3190 (2003).

<sup>7</sup> O’Sullivan, C.K., *Aptasensors-the future of biosensing?* Anal Bioanal Chem, 372, 44-48 (2002).

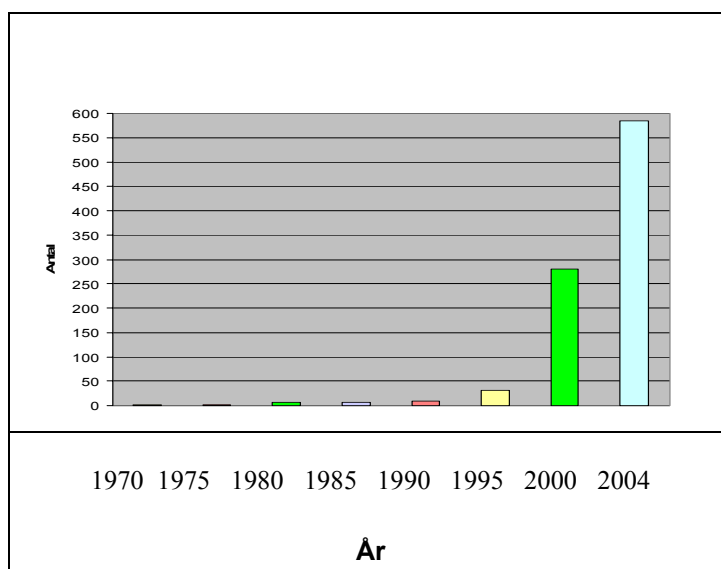
<sup>8</sup> Hjalmarsson, K., Macellaro, A., Norlander, L. *Aptamers-Future tools for diagnostics and therapy*. FOI-R--1216--SE (2004).

<sup>9</sup> Cunliffe, D., Pennadam, S., Alexander, C. *Synthetic and biological polymers – merging the interface*. Eur Polym J, 40, 5-25 (2004).

<sup>10</sup> Consoli, G. M. L., Cunsolo, F., Geraci, C., Mecca, T., Neri, P. *Calix[8]arene-based glycoconjugates as multivalent carbohydrate-presenting system*. Tetrahedron Lett, 44, 7467-7470 (2003).

### 3 Molekylära avtryck, MIP

I början på 1970-talet publicerade Wulff & Sarhan<sup>11</sup> och Takagishi & Klotz<sup>12</sup> oberoende av varandra en ny metod där molekylära avtryck med hög selektivitet kunde formas i en polymer genom att polymerisera monomerer tillsammans med ett templat, se figur 2. MIP har därefter använts inom forskningen som selektiv stationär fas vid t.ex. affinitetskromatografi för separation av isomerer. På 1980-talet presenterade Mosbach's grupp, vid Lund universitet, resultat som visade att det var möjligt att tillverka konstgjorda antikroppar genom att använda MIP-teknologin.<sup>13,14</sup> Antalet publikationer inom området har sedan dess ökat kraftigt, se figur 1. Idag är forskningen till stor del inriktad mot att använda MIP-teknologin för att tillverka syntetiska receptorer med applikationer inom sensorområdet och för design av artificiella enzymer vid tillverkningen av nya katalytiska material.<sup>2, 15, 16</sup>



**Figur 1.** Diagrammet visar antal publikationer inom området MIP, 1970-2004. Värdena är baserade på sökningar i databaserna; Society for Molecular Imprinting, Kalmar Imprinting Database,<sup>17</sup> Medline, Biosis och Chemical Abstracts.

<sup>11</sup> Wulff, G., Sarhan, A. *Über die Anwendung von Enzymanalog Gebauten Polymeren zur Racemattrennung*. *Angew. Chem.* 84, 364 (1972).

<sup>12</sup> Takagishi, T., Klotz, I. M. *Macromolecule-Small Interactions; Introduction of Additional Binding Sites in Polyethyleneimine by Disulfide Cross-Linkages*. *Biopolymers* 11, 483-491 (1972).

<sup>13</sup> Arshady, R., Mosbach, K. *Synthesis of Substrate-selective Polymers by Host-Guest Polymerization*. *Makromol. Chem.* 182, 687-692 (1981).

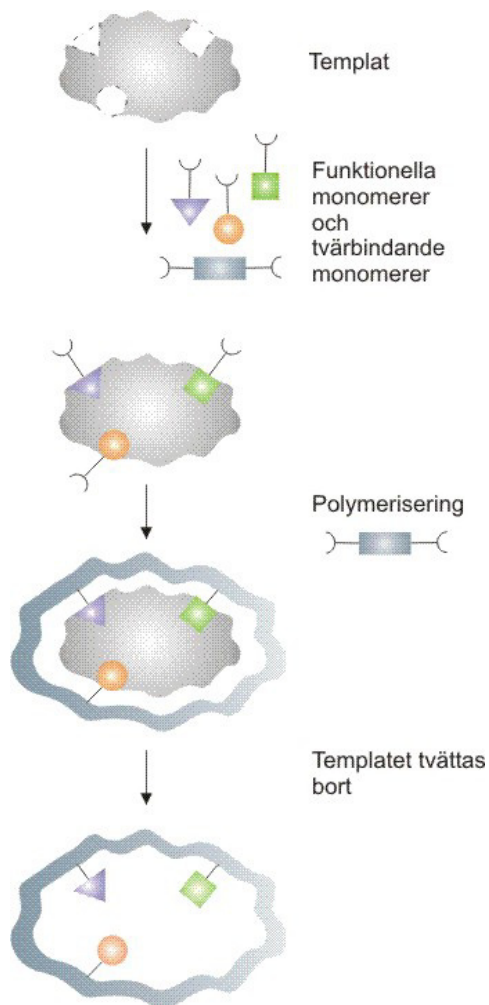
<sup>14</sup> Sellergren, B., Ekberg, B., Mosbach, K. *Molecular Imprinting of Amino Acid Derivatives in Macroporous Polymers*. *J. Chromatogr.* 347, 1-10 (1985).

<sup>15</sup> Pérez-Moral, N., Mayes, A. G. *Novel MIP formats*. *Bioseparation*, 10, 287-299 (2002).

<sup>16</sup> Haupt, K. *Imprinted polymers-Tailor-made mimics of antibodies and receptors*. *Chem Commun*, 171-178 (2003).

<sup>17</sup> URL <<http://www.ng.hik.se/~SMI>>. Website of the Society for Molecular Imprinting, (available 1999-03-24).

De syntetiska bindningsställena som bildas i polymeren är komplementära till det ämne som använts som templat. Detta gäller sådana egenskaper som form, storlek och positionen av funktionella grupper. De polymera avtrycken har därmed potentialen att ge likvärdiga sensor-egenskaper som antikroppar. Avtrycken som är gjorda i ett syntetiskt polymermaterial är rigida och har därför en betydligt bättre stabilitet än naturliga receptorer. Detta gör det möjligt att använda MIP också i extrema miljöer som sura och basiska lösningar, höga temperaturer och tryck.<sup>18</sup> Det finns också andra fördelar, t.ex. kan de syntetiska receptorerna även framställas mot toxiska ämnen vilket normalt kan vara ett problem vid framtagningen av antikroppar. De är också billiga att producera och kan lagras torrt i rumstemperatur över långa perioder.



**Figur 2.** Tekniken baseras på att det ämne som ska detekteras, templatet, blandas med en typ av molekyler, monomerer, som kan binda till varandra och bilda ett polymert material. Funktionella och tvärbindande monomerer, ”cross-linking monomers” polymeriseras tillsammans med templatet. På de funktionella monomererna finns speciella grupper som specifikt binder till templatet.

De funktionella monomererna självansamlas först runt templatet och binder till detta på flera olika ställen. Denna interaktion kan antingen ske genom svaga icke kovalenta bindningar eller på ett förutbestämt sätt bilda reversibla kovalenta bindningar.

I nästa steg startas polymeriseringen, de tvärbindande monomererna binder till de funktionella monomererna och till varandra. De många tvärbindingarna i polymeren hjälper till att fixera de specifikt inbundna monomererna i rätt position.

När polymeriseringen är klar avlägsnas templatet. Detta sker antingen genom extraktion i lösning eller genom kemisk klyvning beroende på typen av bindning. Resultatet blir ett mönsteravtryck som bibehålls i den rigida polymeren. Förutom de unika bindningar som bildas bidrar också dess tredimensionella geometri till att templatet specifikt kan binda till avtrycket.

Hittills är det framför allt små organiska molekyler t.ex. läkemedel, pesticider och kolhydrater som har utgjort templat vid tillverkningen av MIP. Utvecklingen inom området går mot att tillverka molekyllära avtryck för aminosyror och för större ämnen som polypeptider, proteiner och mikroorganismer, se appendix 2. Beroende på den stora kontaktytan hos dessa ämnen och organismer, med fler funktionaliteter, är det betydligt svårare att framställa de syntetiska bindningsställena. Proteinets flexibla struktur försvårar också tillverkningen av

<sup>18</sup> Svenson, J., Nicholls, I. A. *On the thermal and chemical stability of molecularly imprinted polymers.* Anal Chim Acta, 435, 19-24 (2001).

avtryck med väl definierade bindningsställen. För att underlätta produktionen av MIP kan delar av proteinet eller bakterien, en epitop, användas som templat.<sup>19</sup>

De molekylära avtrycken har traditionellt tillverkats genom att först polymerisera allt material i en lösning, s.k. bulkpolymerisering. Det polymera materialet som bildas mals därefter ner till partiklar med en bestämd storlek. Ur sensorsammanhang finns det flera begränsningar med dessa partiklar. Bindningsställena finns inuti partiklarna och därför kan transporten av analyten till och från dessa vara långsam vilket begränsar deras användning.<sup>20</sup> Detta gäller speciellt för makromolekyler och för celler där denna transport kan försvåras av steriska hinder. En intensiv forskning pågår för att utveckla nya alternativa syntesvägar som gör det möjligt att tillverka mindre partiklar och/eller tunna filmer av MIP där bindningsställena finns lokaliserade på eller nära polymerens yta.<sup>3, 21, 22, 23</sup> Tekniker för att immobilisera dessa nanopartiklar och filmer på sensorytor är också under utveckling. Sett mot bakgrund av denna utveckling har MIP en stor potential att användas som igenkänningsmaterial i sensorer med applikationer inom t.ex. klinisk diagnostik, miljöområdet och vid detektion av biologiska stridsmedel.

Interaktionen mellan MIP immobiliserat direkt på sensorytan och det ämne som ska detekteras genererar i likhet med biomolekyler i en biosensor en signal som kan användas för detektion. Signalen omvandlas av en signalomvandlare, ”transducer”, till ett kvantitativt/kvalitativt svar. Det finns flera olika typer av signalomvandlare och valet av lämplig signalomvandlare beror på vilken typ av fysikaliska eller kemiska parametrar som interaktionen ger, se tabell 1 (sid. 35). Känsligheten är beroende på hur effektiv signalöverföringen är mellan MIP och signalomvandlaren, vilket bl.a. beror på hur det igenkännande materialet är immobiliserat till sensorytan och på typen av yta. Selektiviteten hos dessa sensorer avgörs utifrån specificiteten på de bindningsställen som skapats i polymeren och homogeniteten i polymeren.

---

<sup>19</sup> Rachkov, A., Minoura, N. *Towards molecularly imprinted polymers selective to peptides and proteins. The epitope approach.* Biochim Biophys Acta, 1544, 255-266 (2001).

<sup>20</sup> Zimmerman, S.C., Lemcoff, N.G. *Synthetic hosts via molecular imprinting-are universal synthetic antibodies realistically possible?* Chem Commun, 5-14 (2004).

<sup>21</sup> Lotierzo, M., Henry, O. Y. F., Piletsky, S., Tothill, I., Cullen, D., Kania, M., Hock, B. Turner, A. P. F. *Surface plasmon resonance sensor for domoic acid based on grafted imprinted polymer.* Biosens Bioelectron, 20, 145-152 (2004).

<sup>22</sup> Zhang, Z., Liu, Y., Long, Y. Nie, L., Yao. *Effect of the Size of Molecularly Imprinted Polymers Sensing Materials on Piezoelectric Quartz Crystal Sensor Performance.* Anal Sci, 20, 291-295 (2004).

<sup>23</sup> Nicholls, I. A., Rosengren, J. P. *Molecular imprinting of surfaces.* Bioseparation, 10, 301-305 (2002).



## 4 Polymera avtryck som efterliknar naturliga bindningsställen

Bindningsstället hos ett enzym eller hos en receptormolekyl formas av specifika grupper på aminosyrorna, vilka är arrangerade i en tredimensionell struktur. Detta bindningsställe är komplementärt till det substrat det ska binda och interaktionen med aminosyrans specifika grupper sker genom ett flertal icke-kovalenta bindningar. Det är att återskapa denna situation som eftersträvas med MIP, d.v.s. att forma bindningsställen som är komplementära till en målmolekyl med avseende på form och position av funktionella grupper.

Målmolekylens funktionella grupper kan interagera med de funktionella monomerer genom hydrofoba effekter, vätebindningar, jonbindningar och van der Waals interaktioner. För proteiner utgörs de funktionella grupperna av specifika aminosyror som exponeras på proteinets yta och det är den unika distributionen av dessa aminosyror som gör det möjligt att tillverka specifika avtryck.<sup>24</sup> Traditionellt har MIP ett starkt förgrenat nätverk vilket gör avtrycken rigida. Detta gör att polymerens möjlighet att ändra sin konformation vid interaktioner blir liten. Naturligt sker igenkänningsprocesser och interaktioner mellan receptorer t.ex. proteiner och bindande ämnen genom flera steg av konformationsförändringar. Utvecklingen av MIP går därför mot att tillverka avtryck med en viss flexibilitet.<sup>24</sup>

Det finns två specifika metoder för att tillverka MIP. I den ena självansamlas monomererna runt templatet. I den andra syntetiseras de kovalent till templatet före polymeriseringen. Templat med självansamlade monomererna kan avlägsnas från den färdiga polymeren genom extraktion. De starkare bundna kovalenta templatet avlägsnas genom kemisk klyvning. Den ökade stabilitet som kan uppnås under polymeriseringen med kovalent bundna monomerer resulterar oftast till en ökad homogenitet av bindningsställena i den färdiga polymeren. Även antalet bindningsställen i förhållande till templatet blir högre med denna metod. Avtryck med kovalenta interaktioner har oftast använts när analyten varit en mindre organisk förening.<sup>2</sup>

Om de olika funktionella monomerer självansamlas runt målmolekylen och jämviktas före polymeriseringen kan bindningsställen med en låg energikonformation formas. Då polymerens struktur förändras vid regenereringen kan den efter det att målmolekylen avlägsnats återgå till den ursprungliga termodynamisk fördelaktig jämviktsskonformationen med låg energi. Denna flexibilitet gör att strukturen kan bibehållas och målmolekylen kan känna igen och interagera med det syntetiska bindningsstället i den färdiga polymeren.<sup>24</sup>

Fler fördelar med icke kovalent tillverkning av MIP är att avtrycken mer efterliknar biologiska material eftersom de flesta biomolekylära interaktionerna är icke-kovalenta. Metoden ger också en större flexibilitet beträffande valet av monomerer och templat. Svaga interaktioner såsom vätebindningar och elektrostatiska interaktioner mellan monomererna och analyten leder till att avtryck med olika bindningsegenskaper kan skapas av samma templat. Detta kommer att bidra till en lägre selektivitet och en högre ospecifik bindning. Heterogeniteten på bindningsställena kan förutom olika bindningsegenskaper också bero på dess tillgänglighet för templatet, d.v.s. hur bindningsstället är lokaliserat i polymeren. Denna heterogenitet kan minskas genom att t.ex. jämvikten vid polymerisationen ger ett stabilt komplexet

---

<sup>24</sup> Peppas, N. A., Huang, Y. *Polymers and Gels as Molecular Recognition Agents*. Pharm Res, 19, 578-587 (2002).



mellan templatet och de funktionella monomerer. Rigida strukturer med få konformationsförändringar i lösning kan också ge bättre definierade bindningsställen.<sup>25</sup>

Heterogeniteten på bindningsställena försvårar karakteriseringen av MIP eftersom interaktionen blir starkt beroende av koncentrationen på analyten.<sup>26</sup> Höga koncentrationer av analyten resulterar i en låg och stabil separationsfaktor,  $\alpha$ . Detta är en faktor som ofta används vid karakteriseringar och jämförelser av MIP selektivitet och den anger retentionstiden av en analyt i relation till en annan. Vid låga analytkoncentrationer blir däremot värdena på  $\alpha$  höga. Detta beror på att vid låga koncentrationer binder analyten till bindningsställen med hög affinitet och specificitet men vid högre analytkoncentrationer binder det även till bindningsställen med låg affinitet och selektivitet. Denna heterogenitet av bindningsställena i en polymer kan vara en förklaring till den stora variation av bindningskonstanter som har rapporterats i litteraturen för MIP  $K_D \approx 10^{-2} - 10^{-8}$  M. Eftersom MIP tillverkas genom självansamling, dvs. genom icke kovalenta interaktioner, generellt har en högre heterogenitet är det bättre att bestämma hur många bindningsställen som har en viss affinitet än att försöka bestämma affiniteten för polymeren.

De i litteraturen vanligaste beskrivna sätten att studera interaktionen mellan MIP och analyter baseras på bestämningar av polymerens bindningskapacitet. Till exempel kan flera kända koncentrationer av en inmärkt analyt jämviktas med en känd mängd av polymeren och inbindningen kan sedan analyseras med spektroskopiska eller radiologiska metoder.

Information om kinetiska parametrar som jämviktskonstanter och hastighetskonstanter kan fås utifrån bindningskurvor under förutsättning att interaktionen mellan polymer och analyt är svag så att analyten kan dissociera från polymeren.

För att beräkna bindningsparametrarna från en bindningskurva anpassas den först till en lämplig bindningsmodell. Dessa modeller kan delas in i två klasser, diskreta och kontinuerliga distributionsmodeller, beroende på om bindningsställena har en specifik affinitet eller om det finns många bindningsställen med olika affinitet. De kontinuerliga modellerna ger vanligen en bättre anpassning till bindningskurvorna från icke kovalenta avtryck eftersom de molekylära avtryckens heterogenitet innefattas i modellen.

---

<sup>25</sup> Nicholls, I.A. *Towards the rational design of molecularly imprinted polymers*. J Mol Recognit. 11, (1-6) 79-82 (1998).

<sup>26</sup> Umpleby, R. J., Baxter, S. C., Rampey, A. M., Rushton, G. T., Chen, Y., Shimizu, K. D. *Characterization of the heterogeneous binding site affinity distributions in molecularly imprinted polymers*. J Chromatogr B, 804, 141-149 (2004).

## 5 Metodik för tillverkning av MIP

Den vanligaste metoden för storskalig produktion av polymerer är att använda s.k. friradikalpolymerisering. Metoden används bl.a. inom industrin för produktion av olika plastmaterial.<sup>27</sup> Fördelen med friradikalpolymerisering är att den kan utföras under milda betingelser i lösning med temperaturer och tryck som är lämpliga för biologiska målmolekyler. Metoden fungerar bra för olika typer av funktionella grupper och för vattenbaserade lösningsmedel.

En av anledningarna till att metoden är så vanlig för tillverkning av MIP är att det finns ett stort antal kommersiellt tillgängliga funktionella och tvärbindande monomerer, ”cross-linkers”, med vinyl eller akrylgrupper som effektivt kan polymeriseras med denna metod. Dessutom ger friradikalpolymerisering bra utbyten till låga kostnader. Metoden karakteriseras av tre steg; (1) initiering, (2) tillväxande och (3) avslutning. Det är många faktorer som kan påverka det slutgiltiga synteresultatet och speciella protokoll måste tas fram för varje målmolekyl. Det går t.ex. att variera typ och koncentration av målmolekyl, funktionella monomerer och ”cross-linkers”. Det har också stor betydelse för resultatet av polymeriseringen vilken metod som används för initiering, den tid polymeriseringen tar (reaktionshastigheten), reaktionstemperatur och lösningsmedlet i vilken reaktionen sker.<sup>28</sup>

### 5.1 Lösningsmedlets effekt

Många av de MIP som tidigare tillverkats kan endast användas för analyser i organiska lösningsmedel. Detta gör att biologiska ämnen inte är lämpliga för denna teknik. Men under de senaste åren har det utvecklats flera nya metoder för tillverkning av MIP i vattenlösningar och i andra polära lösningsmedel med eller utan vätebindande förmåga. Exempel på sådana lösningsmedel är acetonitril, dimetylsulfoxid (DMSO) och dimetylformamid (DMF).

Önskvärt är att utföra synteser och analyser i ett lösningsmedel där biologiska målmolekylers struktur och funktion bibehålls och där interaktionen mellan monomerer och målmolekyl inte försvagas. Används polära lösningsmedel med hög vätebindande och/eller elektrostatiske kapacitet kan dessa reducera viktiga interaktioner mellan monomererna och proteinet. På liknande sätt kan hydrofoba interaktioner mellan protein och monomerer försvagas ifall organiska lösningsmedel används.

När monomerer som kan ge upphov till starka elektrostatiske eller hydrofoba bindningar används, finns det även risk att avtrycken efterliknar jonbyttarmassa eller hydrofoba material för kromatografiska separationer, vilket bidrar till ospecifika interaktioner. För att reducera sådana effekter och öka specificiteten på interaktionen baseras därför de flesta i litteraturen

---

<sup>27</sup> Cormack, P.A.G., Elorza, A.Z. *Molecularly imprinted polymers: synthesis and characterisation*. J Chromatogr B, 804, 173-182 (2004).

<sup>28</sup> Nicholls, I. A., Adbo, K., Andersson, H. S., Andersson, P. O., Ankarloo, J., Hedin-Dahlström, J., Jokela, P., Karlsson, J. G., Olofsson, L., Rosengren, J., Shoravi, S., Svenson, J., Wikman, S. *Can we rationally design molecularly imprinted polymers?* Anal Chim Acta, 435, 9-18 (2001).

beskrivna metoderna för tillverkning av proteinavtryck på ett stort antal ospecifika och svaga bindningar mellan monomererna och proteinet.<sup>29</sup>

## 5.2 Funktionella monomerer

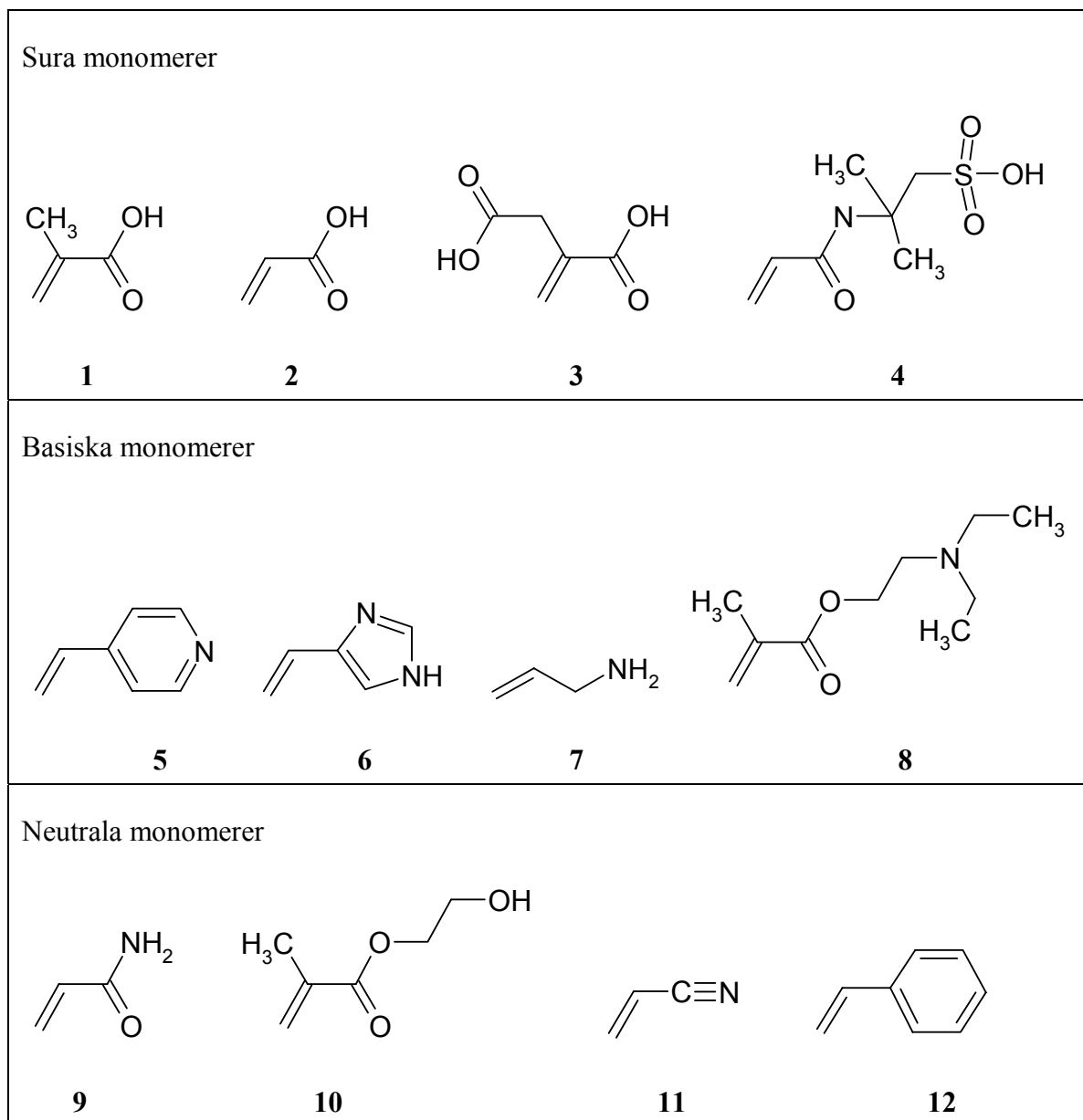
Det kan vara en fördel att använda fler än en sorts monomer vid tillverkningen av MIP, eftersom avtryckens specificitet kan ökas när monomerer med olika funktion kombineras.

Funktionella monomerer kan vara sura, basiska eller neutrala. I figur 3 ges några exempel på monomerer som ofta används vid tillverkningen av polymera avtryck. För att fördelningskvoterna av de inblandade monomererna i de färdiga avtrycken ska överensstämma med ursprungslösningens är det viktigt att dessa har liknande reaktionshastigheter. Flera monomerer är inte förenliga med varandra, vilket kan leda till att en av monomererna övertar och dominerar polymeren i det färdiga avtrycket. För att underlätta sammansättningen av monomerer i avtrycken finns det tabeller framtagna som anger reaktionshastigheten för olika monomerpar.<sup>30</sup>

---

<sup>29</sup> Hjertén, S., Liao, J.-L., Nakazato, K., Wang, Y., Zamaratskaia, G., Zhang, H.-X. *Gels Mimicking Antibodies in Their Selective Recognition of Proteins*. *Chromatographia*, 44, 227-234 (1997).

<sup>30</sup> Brandrup, J., Immergut, E. H., Grulke, E. A. *Polymer Handbook*, fourth ed., Wiley, New York, (1999).



**Figur 3.** Exempel på sura, basiska och neutrala monomerer som används vid tillverkning av MIP (namnen anges på engelska).

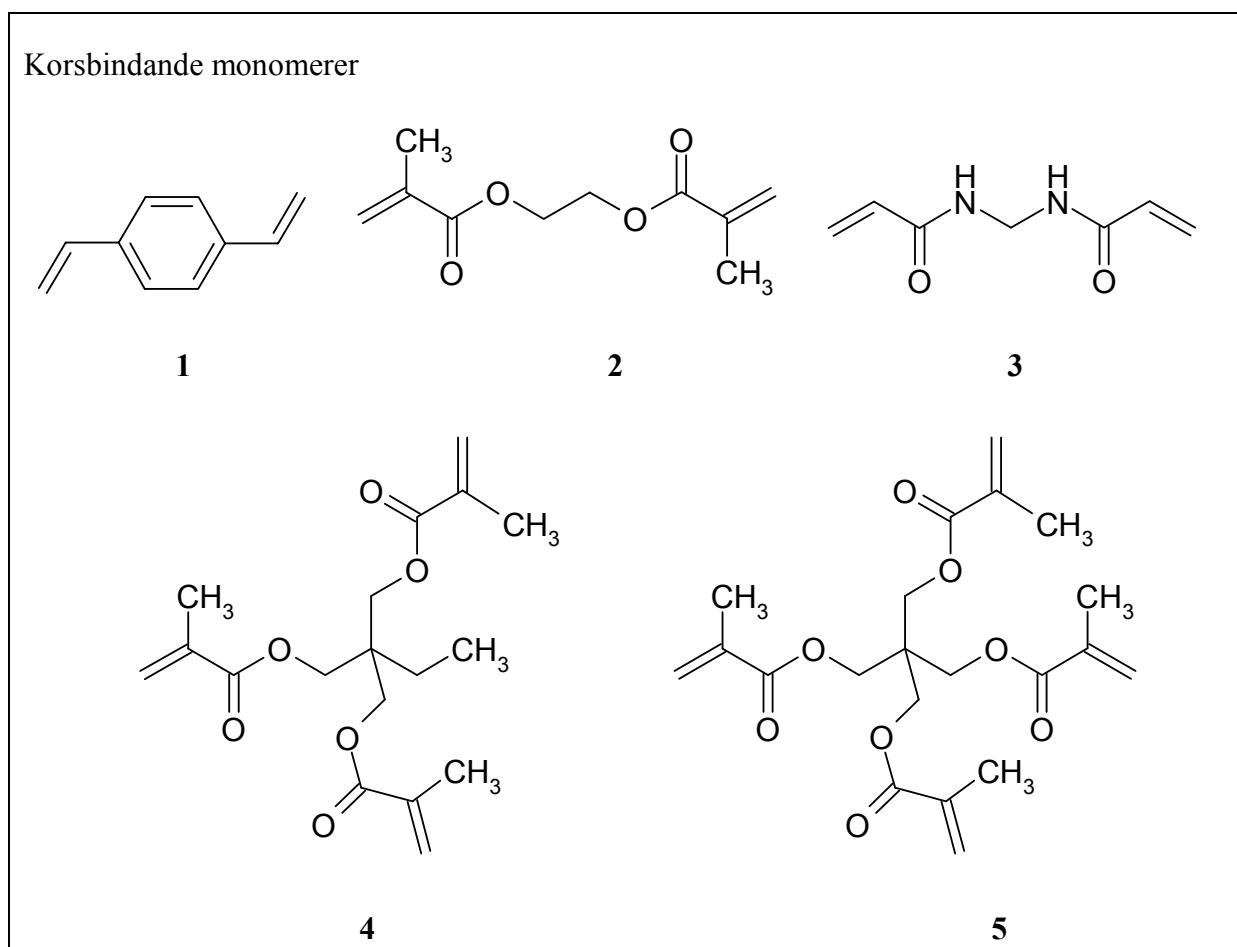
**Sura monomerer;** (1) methacrylic acid (MAA), (2) acrylic acid (AA), (3) itaconic acid (IA), (4) acrylamido-(2-methyl)propane sulfonic acid (AMPSA).

**Basiska monomerer;** (5) 4-vinylpyridine (4-VP), (6) 4-vinylimidazole, (7) allylamine, (8) N,N'-diethylaminoethyl methacrylate (DEAEM).

**Neutrala monomerer;** (9) acrylamide, (10) 2-hydroxyethyl methacrylate (2-HEMA), (11) acrylonitrile (AN), (12) styrene.

### 5.3 Tvärbindande monomerer, "crosslinkers"

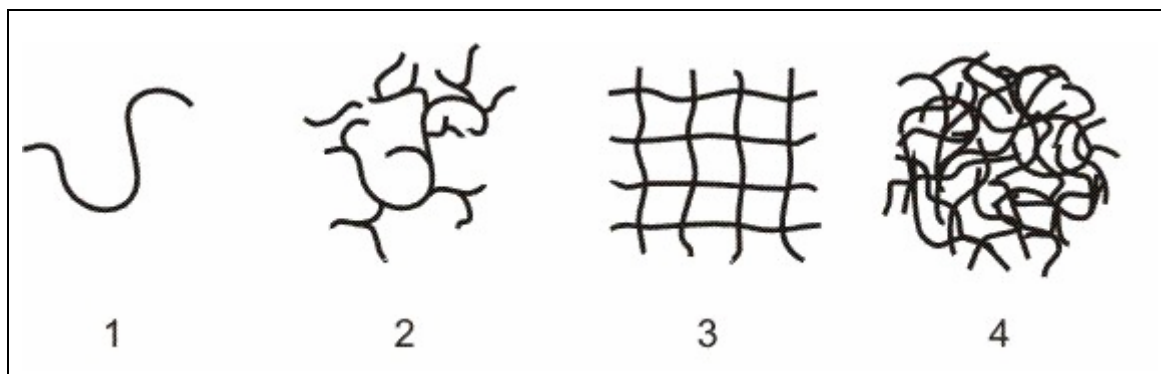
De korsbindande monomerernas struktur och sammansättning, se figur 4, kan påverka polymerens egenskaper på flera olika sätt. Ökat antal reaktiva grupper på de korsbindande monomererna ger generellt en ökad stabilitet och rigiditet hos polymeren. Dessutom kan dessa monomerer beroende på deras sammansättning påverka polymerens porositet och polaritet. Korsbindande monomerer som är amid-baserade ger en mer polär miljö jämfört med de mindre polära metakrylaten och styrenbaserade monomererna vilket är gynnsamt när t.ex. proteiner används som templat.



**Figur 4.** Exempel på tvärbindande monomerer, "cross-linkers" (namnen anges på engelska).

(1) p-divinylbenzene (DVB), (2) ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA), (3) N,N'-methylene bisacrylamide (MDAA), (4) trimethylolpropane trimethacrylate (TRIM), (5) pentaerythritol tetraacrylate (PETEA).

I figur 5 visas olika strukturer på den färdiga polymeren beror på antalet polymeriseringsbara grupper hos de korsbindande monomererna.<sup>27</sup> Monomerer med två grupper för polymerisering ger normalt linjära makromolekyler som är lätta att lösa. Monomerer med flera grupper som kan medverka till polymeriseringen ger vanligen en icke-linjär struktur som kan vara svårlöslig. De icke linjära polymererna kan klassas in i tre huvudgrupper; förgrenade makromolekyler, makroskopiska nätverk och mikrogeler. Det är främst polymerer med en makroskopisk nätverksstruktur som har studerats och används inom MIP-teknologin.



**Figur 5.** Exempel på polymerstrukturer; (1) Linjär, (2) Förgrenad, (3) Makroskopiska nätverk och (4) Mikrogel.

Fördelningen mellan funktionella och tvärbindande monomerer påverkar också de molekylära avtryckens flexibilitet.<sup>31</sup> Högt inslag av korsbindande monomerer ger oftast rigida polymerer som är mekaniskt starka, vilket kan vara en fördel när MIP används som stationär fas vid kromatografiska applikationer. När MIP används som filmer i sensorer har det i vissa fall visat sig att en viss flexibilitet hos polymerfilmen förbättrar inbindningen av templaten.<sup>32</sup> Vid syntes av MIP-filmer är det därför viktigt att optimera kvoten av funktionella och korsbindande monomerer för att få en viss flexibilitet men samtidigt bibehålla strukturen på de molekylära avtrycken.

#### 5.4 Initiering av polymeriseringen

Friradikalpolymerisering kan initieras termiskt eller fotokemiskt. Exempel på UV-initierande kemikalier, s.k. initiatörer, som används vid syntes av MIP är azobisnitriles t.ex. azobis(isobutyronitrile) (AIBN) och azobis-(2,4-dimethylvaleronitrile) (ABDV). Vid termisk initiering genereras radikaler. Detta sker genom att värma reaktionslösningen till en temperatur som ger en lagom hastighet på reaktionen, ca. 40-60°C. För termiskt instabila templaten såsom peptider och proteiner, är det gynnsammare om de fria radikalerna genereras genom UV-strålning vilket kan ske vid låga temperaturer, 4°C. Reaktionshastigheten blir då betydligt långsammare, vilket gör att polymeriseringen tar längre tid. Selektiviteten hos de färdiga molekylära avtrycken kan variera beroende på hur initieringen av polymerisationen skett. Fotokemiskt tillverkade polymerer uppvisar bättre selektiva egenskaper vid analyser i rumstemperatur, medan termiskt initierade polymerer, har bättre funktion vid högre temperaturer.<sup>33</sup>

#### 5.5 Molekulära avtryck tillverkade utifrån epitop

Ett sätt att optimera förutsättningar för tillverkningen av MIP där templaten är en större substans t.ex. polypeptider, proteiner och bakterier är att använda en del av makromolekylen,

<sup>31</sup> Sellergren, B. *Molecularly imprinted polymers. Man-made mimics of antibodies and their applications in analytical chemistry*. Elsevier Science Amsterdam, The Netherlands (2001).

<sup>32</sup> Blanco-López, M. C., Lobo-Castañón, M. J., Miranda-Ordieres, A. J., Tuñón-Blanco, P. *Electrochemical sensors based on molecularly imprinted polymers*. Trends Anal Chem, 23, 36-48 (2004).

<sup>33</sup> Narayanaswamy, R., Wolfbeis, O. S., *Optical Sensors: Industrial, Environmental and Diagnostic Application*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany (2004).

epitopen, som templat. Denna metod har använts vid framställning av syntetiska receptorer för proteinet oxytocin.<sup>19</sup> En kort peptid (4 aminosyror) från proteinets C-terminal användes vid tillverkningen av dessa molekylära avtryck. Sekvens valdes utifrån studier med oxytocin som visat att just denna sekvens har stor betydelse vid interaktioner mellan hormonet och andra ämnen. De molekylära avtrycken tillverkade utifrån epitopen hade högre specificitet för oxytocin, jämfört med olika kontrollsubstanser. Analoger till oxytocin som innehöll den C-terminala peptidsekvensen kunde också specifikt registreras av de molekylära avtrycken.

## 5.6 MIP baserade på metallkoordinering

Flera arbeten har publicerats där interaktionen mellan MIP och proteinet baseras på en metallkoordinering.<sup>34,35</sup> Den här metoden kan användas för proteiner som exponerar den metallkoordinerande aminosyran histidin på ytan. Imidazol-gruppen på histidin har en hög affinitet för 2-värda metalljoner som  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  och kan bilda komplex med specifika monomerer via dessa metalljoner.

Till exempel har RNAs använts som templat vid tillverkning av MIP baserade på metallkoordinering.<sup>34</sup> De molekylära avtrycken syntetiserades på ytan av kiselpartiklar, där de funktionella monomererna bildade metalljonkomplex med proteinet via  $\text{Cu}^{2+}$ -joner. De bildade polymera avtrycken hade en viss selektivitet för proteinet. Separationen av RNAs med kiselpartiklar framställda i närvaro av RNAs visade på en ca 50% bättre separation jämfört med kontrollkiselpartiklar.

## 5.7 Datoroptimering av molekylära avtryck

För att underlätta valet av funktionella monomerer vid tillverkningen av molekylära avtryck kan man använda sig av modellerings- och simuleringsprogram, s.k. computational design.<sup>36</sup> Interaktionen mellan proteinet och monomererna simuleras i ett dataprogram och funktionella monomerer med hög affinitet för proteinet kan tas fram från ett virtuellt bibliotek. I detta bibliotek finns det monomerer med olika egenskaper som kan bilda t.ex. jonbindningar, vätebindningar eller van der Waals interaktioner med proteinet. Med datoroptimering kan dielektriska konstanter och laddningar på proteinet och monomererna varieras så att de efterliknar betingelserna vid den experimentella polymeriseringen. Det är också möjligt att förutsäga den färdiga polymerens specificitet och affinitet. Cranfield Centre for Supramolecular Technology har tagit fram ett protokoll för modellering av komplexbildningen mellan templatet och de funktionella monomererna. Detta protokoll för design av molekylära avtryck kan delas in i 5 steg:<sup>37</sup>

---

<sup>34</sup> Kempe, M., Glad, M., Mosbach, K. *An Approach Towards Surface Imprinting Using the Enzyme Ribonuclease A*. J Mol Recognit, 8, 35-39 (1995).

<sup>35</sup> Mallik, S., Plunkett, S. D., Dhal, P. K., Johnson, R. D., Pack, D., Shnek, D., Arnold, F. H. *Towards materials for the specific recognition and separation of proteins*. New J Chem, 18, 299-304 (1994).

<sup>36</sup> Chianella, I., Lotierzo, M., Piletsky, S. A., Tothill, I. E., Chen, B., Karim, K., Turner, A. P. F. *Rational Design of a Polymer Specific for Microcystin-LR Using a Computational Approach*. Anal Chem, 74, 1288-1293 (2002).

<sup>37</sup> URL <<http://www.cranfield.ac.uk>>

1. En modell av proteinet på molekylär nivå skapas och laddningar för varje atom beräknas. Detta ger en bild på proteinets polaritet och laddningsfördelning på ytan.
2. En databas med funktionella monomerer designas, dessa kan vara sura, basiska eller neutrala.
3. Varje monomers interaktion med proteinet undersöks och de med högst affinitet väljs ut för att användas vid simulering.
4. Simuleringsförsök på interaktionen mellan monomerer med hög affinitet och proteinet genomförs vilket ger en optimering av monomer/protein sammansättningen. Det är alltså möjligt att väljas ut lämpliga monomerer och bestämma vilka kvoter på monomer/protein som ger bäst resultat vid tillverkningen av polymeren.
5. Den designade polymeren syntetiseras och analyseras experimentellt.





## 6 Format på MIP

MIP har vanligtvis tillverkats som partiklar i  $\mu\text{m}$ -området och packats i kolonner för att användas som stationär fas vid separationer. Denna storlek på partiklar har också ofta används för att demonstrera nya principer för tillverkning av MIP. För bl.a. sensorapplikationer är dessa partiklar för stora, varför strävanden idag inriktas på att tillverka MIP i form av nanopartiklar eller som tunna filmer.<sup>3</sup>

Med nanopartiklar och tunna filmer kommer bindningsställena närmare polymerens yta. Detta underlättar avlägsnandet av templat vid framställningen. Vidare kan transporten av analyt till och från de molekyllära avtrycken ske snabbare. Interaktionen mellan analyt och polymer kan också ske närmare sensorytan och därmed närmare signalöverföringssystemet, vilket ökar känsligheten i sensorapplikationer. Antalet bindningsställen hos nanopartiklar kan ökas eftersom den totala arean på MIP-partiklarna blir större.<sup>15</sup> Nedan ges några exempel på metoder för framställning av polymera partiklar och filmer.

### 6.1 MIP-partiklar

#### *Polymerisering i lösning, bulk polymerisation*

Det finns flera olika metoder för att producera MIP-partiklar av specifik storlek och struktur. Den vanligaste metoden för att syntetisera MIP-partiklar är polymerisering i lösning, s.k. bulk polymerisation. Denna metod kan generellt beskrivas enligt följande; monomerer, initiator och templat blandas i en lösning varefter polymeriseringen startas. Det bildade polymermaterialet torkas, mals och silas vilket ger partiklar med en viss storleksfördelning. Därefter tvättas polymerpartiklarna och templatet avlägsnas.

#### *Kiselpartiklar*

Molekyllära avtryck kan också syntetiseras direkt på kiselpartiklar vilket gör att partiklarnas storlek och struktur bättre kan kontrolleras. Till exempel har molekyllära avtryck av en hydrolysisprodukt från soman, pinakolyl metylfosfonat, framställts på kiselpartiklar.<sup>38</sup> De molekyllära avtrycken formades på partiklarnas yta, vilka hade en diameter på ca 400-600 nm, genom att polymerisera templatet tillsammans med monomererna. Kiselpartiklar med molekyllära avtryck hade en signifikant större affinitet för templatet jämfört med andra strukturellt liknande fosfonater. Eftersom partiklar inte maldes ner efter tillverkningen blev det bara avtrycken på ytan som var tillgängliga för templatet.

#### *Utfällning*

Ye *et al.* syntetiserade MIP-partiklar med en diameter på ca 300 nm genom att använda en metod där partiklarna fälls ut i lösningen.<sup>39</sup> Molekyllära avtryck tillverkades för två olika templat, theophyllin och estradiol. De funktionella monomererna, initiator och templat polymeriserades samtidigt i en lösning av acetonitril. Detta resulterade i bildandet av polymera partiklar som sedan sedimenterade i lösningen. Partiklarna var rigida, beroende på ett starkt förgrenat polymert nätverk, vilket gjorde att de inte koagulerade. Polymerpartiklarnas bind-

<sup>38</sup> Markowitz, M. A., Deng, G., Gaber, B. P. *Effects of Added Organosilanes on the Formation and Adsorption Properties of Silicates Surface-Imprinted with an Organophosphonate*. Langmuir, 16, 6148-6155 (2000).

<sup>39</sup> Ye, L., Cormack, P. A. G. Mosbach, K. *Molecularly imprinted monodisperse microspheres for competitive radioassay*, Anal Commun, 36, 35-38 (1999).

ningsegenskaper studerades radiologiskt och resultaten visade att theophyllin och estradiol hade 3-4 gånger högre affinitet för de syntetiska bindningsställena jämfört med kontrollämnen. Bindningskapaciteten var också högre jämfört med MIP-partiklar tillverkade genom malning.

#### *Poröst kisel*

Yilmaz *et al.*<sup>40</sup> har presenterat en metod för tillverkning av MIP-partiklar. I denna börjar man med att templatet immobiliseras till en fast support, t.ex. poröst kisel. Därefter initieras polymeriseringen vilken sker i porerna på det porösa kiset. När polymeriseringen är klar avlägsnas kiset genom en kemisk upplösning vilket resulterar i en porig polymerstruktur med de molekylära avtrycken lokaliserade på ytan av polymeren. Partiklarnas affinitet för templatet, theophyllin, var jämförbar med affiniteter från polymerpartiklar tillverkade enligt det klassiska sättet, dvs. malning till rätt storlek efter polymeriseringen. Den totala bindningskapaciteten var emellertid något lägre. Med den här metoden kan MIP tillverkas för ämnen som är olösliga i den lösning som används vid polymeriseringsprocessen. Homogeniteten på bindningsställena blir högre därför att orienteringen på templatmolekylen kan kontrolleras och tillgänglighet till bindningsställena blir bättre eftersom de exponeras på ytan.

Poröst kisel i kombination med förpolymeriserade lösningar har också använts för att tillverka MIP-partiklar.<sup>41</sup> Denna metod baseras på att porösa kiselpartiklar, 13 µm, fylls med en förpolymeriserad lösning. Därefter startas polymeriseringen vilket resulterar i bildandet av kisel-polymerpartiklar av samma format som kiselpartiklarna. Det porösa kiset avlägsnas sedan genom kemisk upplösning vilket leder till partiklar som består endast av polymeren. Sfäriska polymerpartiklar med en uniform storlek kan således produceras. Detta är svårt med traditionella metoder som inkluderar malning och silning. Metoden är också snabbare jämfört med de traditionella metoderna. Polymerpartiklarna uppvisade en kiral selektivitet för templatet, (-)-isoproterenol, d.v.s. att det var möjligt att separera det från dess optiska isomer (+)-isoproterenol.

## **6.2 MIP-filmer**

### *”Spin-coating” och ”Drop-coating”*

”Spin-coating” eller ”solvent casting” är olika namn på en vanlig metod för att tillverka polymerfilmer på fasta ytor. Med denna metod kan en monomerlösning med templat eller en förpolymeriserad lösning slungas ut över en yta som roterar med hög hastighet. Lösningsmedlet evaporeras därefter vilket resulterar i bildandet av en polymerfilm. Ett exempel där polymeriseringen skedde efter det att filmen hade formats på ytan är vid tillverkningen av molekylära avtryck för kiral separation av O-bensoylvinsyra.<sup>42</sup> Tvättade glasplattor modifierades först med triklorosilylpropylmetakrylat därefter slungades en lösning med monomerer, initiator och templat ut över ytan och polymeriseringen initierades genom UV-strålning. De färdiga MIP-filmerna uppvisade en kiral separation för isomererna R och S

<sup>40</sup> Yilmaz, E., Haupt, K., Mosbach, K. *The Use of Immobilized Templates – A New Approach in Molecular Imprinting*. *Angew. Chem Int*, Ed. 39, 2115-2118 (2000).

<sup>41</sup> Yilmaz, E., Ramström, O., Möller, P., Sanchez, D., Mosbach, K. *A facile method for preparing molecularly imprinted polymer spheres using spherical silica templates*. *J Mater Chem*, 12, 1577-1581 (2002).

<sup>42</sup> Nopper, D., Lammershop, O., Wulff, G., Gauglitz, G. *Amidine-based molecularly imprinted polymers-new sensitive elements for chiral chemosensors*. *Anal Bioanal Chem*, 377, 608-613 (2003).

O-bensoylvinsyra med en separationsfaktor,  $\alpha$ , på 1.2. Det skedde ingen separation med polymerfilmer tillverkade utan templat.

”Drop-coating” är en metod där polymerfilmer kan produceras genom att droppa en monomerlösning med templat som sedan polymeriseras eller en förpolymeriserad lösning till en yta.<sup>43</sup> ”Spin-coating” och ”drop-coating” kan också användas för att immobilisera MIP-partiklar till en yta.<sup>22</sup> De färdiga polymerpartiklarna späds i ett lösningsmedel och appliceras sedan på ytan med dessa tekniker. Därefter får lösningsmedlet dunsta in varvid filmen adsorberas till ytan.

#### ”Photografting”

Tunna filmer av MIP har även tillverkats på membranytor av polypropylen och på guld-elektroder genom att använda en ”grafting”-polymeriseringsmetod.<sup>44, 45</sup> Panasyuk-Delaney *et al.* har använt den här metoden för att syntetisera polymerfilmer med bindningsställen för herbiciden desmetryn på guldelektrodytor.<sup>45</sup> Metoden kan kort beskrivas enligt följande; först immobiliseras en alkylthiol till guldytan och därefter en fotoinitiator, benzophenone. Monomerer och templat tillsätts och initiatorn belyses med UV-ljus vilket startar en polymerisering intill den fasta ytan. Templat och överskottsmonomerer avlägsnas sedan vilket resulterar i en tunn polymerfilm på ytan.

#### Stämplingsmetod

Dickert *et al.*<sup>46</sup> har använt en stämplingsmetod för att tillverka polymerfilmer och sol/gelfilmer, som är ett gelformigt lösningsmedel, på sensorytor anpassade för kvartskristallmikrobalans, quartz crystal microbalance QCM, se figur 6. Molekylära avtryck av jästceller formades direkt på sensorytan genom att använda denna metod. Analyser med AFM visade att avtrycken var tätt packade och att cellerna inkorporerades till hälften i polymerfilmen, avtrycken var  $\approx 1\mu\text{m}$  djupa. Respons från QCM observerades bara på polymerfilmer med avtryck, ingen ospecifik bindning kunde registreras på kontrolltytor utan avtryck, se appendix 2.

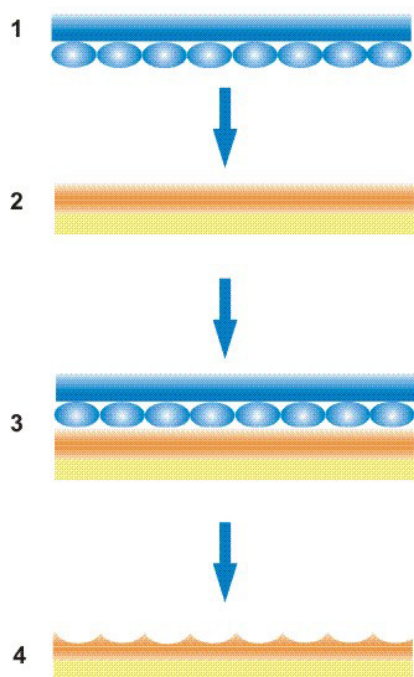
---

<sup>43</sup> Zhang, Z., Li, H., Liao, H., Nie, L., Yao, S. *Influence of cross-linkers' amount on the performance of the piezoelectric sensor modified with molecularly imprinted polymers.* Sens Actua B, 105, 176-182 (2005).

<sup>44</sup> Piletsky, S. A., Matuschewski, H., Schedler, U., Wilpert, A., Piletska, E. V., Thiele, T. A., Ulbricht, M. *Surface Functionalization of Porous Polypropylene Membranes with Molecularly Imprinted Polymers by Photograft Copolymerization in Water.* Macromolecules, 33, 3092-3098 (2000).

<sup>45</sup> Panasyuk-Delaney, T., Mirsky, V. M., Ulbricht, M., Wolfbeis, O. S. *Impedometric herbicide chemosensors based on molecularly imprinted polymers.* Anal Chim Acta, 435, 157-162 (2001).

<sup>46</sup> Dickert, F. L., Hayden, O. *Bioimprinting of Polymers and Sol-Gel Phases. Selective Detection of Yeasts with Imprinted Polymers.* Anal Chem, 74, 1302-1306 (2002).



**Figur 6.** Stämplingsteknik för tillverkning av molekylära avtryck på sensorytor. Proceduren är enligt följande;

1. En stämpel framställs genom att immobilisera målmolekylen på t.ex. en glasyta.
2. På sensorytan immobiliseras en polymerfilm, denna kan t.ex. formas på sensorytan genom "spin-coting" eller "drop-coating" av en utspädd för-polymeriserad lösning.
3. StämpeIn pressas sedan mot polymerfilmen.
4. Efter polymeriseringen avlägsnas stämpeIn och resterande målmolekyler tvättas bort, vilket exponerar de syntetiska bindningsställena.

### Elektropolymerisering

Elektropolymerisering är en metod som har använts för att immobilisera tunna polymerfilmer på sensorytor. Molekylära avtryck har t.ex. formats på en platinaelektrod, anpassad för QCM, genom att använda cyklisk voltametri, CV.<sup>47</sup> Polymerfilmen bildades på elektrodytan genom att elektro-syntetisera monomererna, poly(o-phenylene diamine) tillsammans med templatet glukos. Tjockleken på filmen kunde kontrolleras genom tillförd laddning vid CV. Med den här metoden var det möjligt att tillverka polymerfilmer som endast var 10 nm i tjocklek. Analyser av polymerfilmernas bindningsegenskaper visade att det fanns två typer av bindningsställena med  $K_D$  på 34 mM respektive 4.6 mM. Nackdelar med elektropolymerisering är att det krävs en elektriskt ledande yta och att tekniken jämfört med den klassiska metoden att tillverka MIP, genom fri radikal polymerisering, endast är kompatibel med ett fåtal varianter av funktionella monomerer.

### Sandwichteknik

En teknik som ofta har använts för att tillverka tunna filmer på QCM-sensorytor är den s.k. Sandwichtekniken. Till exempel kan en droppe av en kall polymeriseringslösning som består av templat, monomerer och en polymeriseringsinitiator deponeras på en sensoryta av guld. Därefter täcks ytan direkt med en kvartsplatta och polymeriseringen initieras med UV-ljus. När polymeriseringen är klar avlägsnas den täckande kvartsplattan från polymerfilmen genom att filmen med glasplattor sänks ner i en lösning, t.ex. etanol. Separationen mellan kvartsplattan och polymerfilmen kan ske genom att polymerfilmen binder hårdare till guld-ytan. Haupt *et al.* har använt denna teknik för att utveckla en kemisk sensor baserad på MIP som syntetiska receptorer och QCM för signalöverföringen.<sup>48</sup> Som templat användes en kiral

<sup>47</sup> Malitesta, C., Losito, I., Zambonin, P. G. *Molecularly Imprinted Electrosynthesized Polymers: New Materials for Biomimetic Sensors*. *Anal Chem*, 71, 1366-1370 (1999).

<sup>48</sup> Haupt, K., Noworyta, K., Kutner, W. *Imprinted polymer-based enantioselective acoustic sensor using a quartz crystal microbalance*. *Anal Commun*, 36, 391-393 (1999).

$\beta$ -blockerande drog, S-propranolol, och med denna sensor var det möjligt att urskilja R- och S-propranolol, se appendix 1.



## 7 Metoder för karakterisering av MIP

Metoder som används för karakterisering av MIP kan delas in i tre grupper; (1) kemisk, (2) strukturell och (3) biofysikalisk.<sup>27</sup>

### 7.1 Kemiska metoder

Vid kemiska karakteriseringen kan t.ex. information om polymerens grundämnessammansättning, polaritet, kvoter mellan olika monomerer och mobiliteten på polymeren fås. Exempel på metoder för kemisk karakterisering ges nedan.

#### *”Fourier-transform infrared spectroscopy”, FTIR*

Med FTIR kan den kvantitativa sammansättningen hos polymeren bestämmas genom att jämföra spektra av de enskilda monomererna med polymerens. Metoden är särskilt bra när de ingående komponenterna i polymeren, funktionella monomerer och tvärbindande ämnen, skiljer sig kemiskt från varandra. Med FTIR kan också information om polymerfilmens struktur och dynamik fås.

#### *Kontaktvinkel*

Med kontaktvinkelmätningar kan en ytas polaritet bestämmas. Genom att mäta den vinkel som bildas när en droppe vatten eller lösningsmedel,  $\approx 10 \mu\text{l}$ , appliceras på polymerfilmen kan dess yta klassificeras som hydrofob eller hydrofil. Med denna metod kan även ytojämnheter i polymerfilmen bedömas.

#### *Elementanalys*

Metoden kan ge information om hur den elementära kompositionen, d.v.s. fördelningen av kol, väte, kväve, etc. är i en viss substans. Den baseras på att en känd mängd av ett okänt ämne överförs via förbränning till enklare ämnen. Till exempel kan andelen kol och väte i polymeren bestämmas genom att omvandla föreningar med dessa grundämnen till koldioxid och vatten. Genom att jämföra teoretiskt beräknade kvoter av monomerer, vid 100 % utbyten, med experimentell data kan man få information om i vilken grad de olika monomererna har inkorporerats i polymeren.<sup>31</sup>

### 7.2 Strukturella metoder

För att bestämma strukturen på MIP, t.ex. tillgängligheten på avtrycken, antal bindningsställen, densiteten på bindningsställena och porernas storlek kan följande metoder användas.

#### *Porernas storlek*

I torrt tillstånd är polymererna vanligtvis porösa och gas kan tas upp i polymerpartiklarnas nätverk av porer. Genom att använda kvävgas och mäta mängd absorberad gas i polymeren som funktion av tryck kan förutom den specifika volymen ( $\text{ml/g}$ ) på porerna i partikeln även den specifika ytarean ( $\text{m}^2/\text{g}$ ) på partiklarna, medelvärde på porernas diameter samt storleksfördelningen på porerna bestämmas.<sup>27</sup>

#### *Mikroskopi*

Transmission elektronmikroskopi, TEM, skanning elektronmikroskopi, SEM, eller atomkraftmikroskopi, ”Atomic force microscopy”, AFM kan användas för att undersöka MIP-partiklar och MIP-filmers morfologiska egenskaper. Till exempel kan information om polymerpartiklarnas form, storlek, och homogenitet (distribution av partikelstorlekar) fås. Poly-



merfilmer kan t.ex. analyseras med avseende på de polymera avtryckens densitet och utformning samt filmens ytäckning och jämnhet. Med AFM kan analyserna utföras i vätska och upplösningen är i jämförelse med TEM och SEM större, den är på molekylär eller atomär nivå.

#### *Ellipsometri*

Ellipsometri är en optisk metod med vilken det är möjligt att bestämma tjockleken på polymerfilmer immobiliserade på en reflekterande yta. Mätningarna kan utföras i både vätska och luft utan inmärkning och med en upplösning på 1 Å.

### **7.3 Biofysikaliska metoder**

Vid den biofysikaliska karakteriseringen analyseras bindningskinetiken mellan MIP och målmolekylen samt polymerens bindningskapacitet dvs. hur stor mängd av målmolekylen som kan binda in till polymeren. Den biofysikaliska karakteriseringen underlättar jämförelser mellan olika MIP och optimering av de molekylära avtrycken. Exempel på metoder som kan används för att studera bindningsegenskaper tas upp nedan.

#### *Radiologiska och fluorescensbaserade metoder*

MIP bindningsegenskaper har studerats med hjälp av fluorescens- eller radioaktivt inmärkta molekyler. Dessa bindningsstudier har baserats på experimentella bindningskurvor där t.ex. olika koncentrationer av inmärkta analyter interagerat med polymeren tills en jämvikt erhållits. Resultat har sedan plottas som koncentration bunden analyt mot koncentrationen av fri analyt i lösningen. På samma sätt kan inmärkta analyter användas för kompetitiva bindningsstudier.<sup>49</sup>

#### *"Fourier transform infrared spectroscopy", FTIR-spektroskopi*

Utifrån tidsberoende absorptionskurvor kan den selektiva och reversibla bindningen av analyten studeras i realtid utan inmärkning av molekylerna. Karakteristiska IR-spektra "fingerprint" kan genereras för varje analyt utifrån dess sammansättning av specifika grupper och struktur. Detta ger en bra differentiering av de olika analyterna som binder till polymeren dvs. specifik och ospecifik bindning. Med metoden är det också möjligt att t.ex. följa syntesen av polymerfilmen.

#### *Ytplasmonresonans, "Surface plasmon resonance", SPR*

Med SPR kan interaktionen mellan en polymerfilm immobiliserad till en fast yta och målmolekylen studeras i realtid utan inmärkning av molekylerna. Med kommersiella instrument som Biacore kan bindningskurvor från interaktionen mellan analyt och polymer anpassas till en programvara med olika bindningsmodeller. Utifrån dessa modeller kan jämviktskonstanter och hastighetskonstanter beräknas. SPR baseras på de brytningsindexförändringar som sker, inom ett magnetiskt fält, nära en optisk sensoryta när molekyler binder till eller dissocierar från ytan.

#### *Kvartskristallmikrobalans, "Quartz crystal microbalance", QCM*

Bindningskinetik mellan polymerfilmer på fasta ytor och målmolekyler kan också studeras med hjälp av ett masskänsligt detektionssystem, QCM. Sensorytan i QCM är en tunn kvartskristall, vanligtvis belagd med guld, som oscillerar med en viss frekvens och vid

---

<sup>49</sup> Lavignac, N., Allender, C. J., Brain, K. R. *Current status of molecularly imprinted polymers as alternatives to antibodies in sorbent assays*. Anal Chim Acta, 510, 139-145 (2004).

inbindning av ämnen till ytan eller till en immobiliserad polymerfilm ändras denna frekvens. Syntesen av polymerfilmen kan ske direkt på sensorytan och dess bildande och den färdiga polymerfilmens interaktion med målmolekylen kan observeras i realtid. Med QCM kan också förändringar i viskoelastiska egenskaper hos polymerfilmer analyseras.

#### *Elektrokemiska metoder*

Interaktioner mellan molekylära avtryck och målmolekyler som genererar någon form av elektroaktiva förändringar kan analyseras med hjälp av elektrokemiska metoder. Polymerfilmer kan immobiliseras direkt på elektrodytor och de molekylära avtryckens affinitet för målmolekylen bestämmas. Exempel på elektrokemiska signalöverföringssystem som använts i kombination med MIP är voltammetriska, konduktometriska, kapacitiva, potentiometriska, jonselektiva fälteffekts transistorer ISFET och amperometriska.



## 8 Signalöverföring

Under de senaste åren har stora satsningar gjorts för att kombinera MIP-teknologin med olika typer av sensorer. Tunna filmer eller partiklar av MIP har används som syntetiska receptorer för flera olika substanser som aminosyror, peptider, proteiner celler, kolhydrater, vitaminer, droger och pesticider, se appendix 1 och 2. För att registrera interaktionen mellan de molekylära avtrycken och en provlösning kan olika signalomvandlare användas. Valet av tekniker beror på vilken kemisk eller fysikalisk parameter som genereras vid denna interaktion.<sup>3</sup> Exempel på mätbara parametrar som reaktionerna kan generera och vilka signalomvandlare som kan användas finns angivna i tabell 1. Största andelen av befintliga publicerade artiklar utnyttjar en detektionsprincip där massförändringar registreras, QCM. Men MIP har också använts i kombination med olika optiska och elektrokemiska signalöverföringssystem. Av de elektrokemiska detektionsprinciperna har den voltametriska mätprincipen använts mest.<sup>50</sup>

Förutom de fysikaliska och kemiska förändringar som genereras vid interaktionen mellan de molekylära avtrycken och templatet kan olika typer av markörer "reporter groups" som fluorescerande och radioaktiva grupper användas för att öka känsligheten vid optisk detektion. Dessa markörer kan inkorporeras i polymeren och några exempel där sådana förstärkningar har använts ges nedan.

**Tabell 1.** Exempel på mätbara kemiska och fysikaliska förändringar som kan genereras direkt vid interaktionen mellan polymer och templat och förändringar från markör i polymeren. Samt vilken signalöverföring som kan användas för att registrera denna förändring. "Surface plasmon resonance" (SPR), "Fourier-transform infrared spectroscopy" (FTIR), "Ion-sensitive field-effect transistor" (ISFET), "Quartz crystal microbalance" (QCM)

Signal	Mätbara kemiska och fysikaliska förändringar	Signalöverföring/"Transducer"
Direkt från interaktionen mellan polymer och analyt	<i>Optisk</i> ; fluorescens (intensitet, spektral skift, anisotropi/polarisation, fluorescenslivstid), luminiscens, brytningsindex  <i>Elektrokemisk</i> ; ström, spänning, kapacitans, ledningsförmåga  <i>Massförändringar</i> ; massa	Spektroskopi, SPR, FTIR  Elektroder, ISFET  QCM
Från markör i polymeren	<i>Optisk</i> ; fluorescens, (intensitet, spektral skift, anisotropi/polarisation, fluorescenslivstid), luminiscens	Spektroskopi

<sup>50</sup> Blanco-López, M. C., Gutiérrez-Fernández, S., Lobo-Castañón, M. J., Miranda-Ordieres, A. J., Tuñón-Blanco, P. *Electrochemical sensing with electrodes modified with molecularly imprinted polymer films*. *Anal Bioanal Chem*, 378, 1922-1928 (2004).

*Fluorescens*

Flera arbeten har publicerats där MIP har kombinerats med en detektionsprincip baserad på fluorescens.<sup>51, 52</sup> I de flesta av dessa arbeten har antingen den bindande målmolekylen varit fluorescerande eller inmärkt med ett fluorescerande ämne vilket medför att dessa sensorer är bäst lämpade för att användas vid detektion av fluorescerande molekyler. Satsningar har därför gjorts för att inkorporera det fluorescerande ämnet i de polymera avtrycken för att tillverka en mer generell sensor och för att förstärka signalen vid detektionen. Liao *et al.*<sup>53</sup> har publicerat en artikel där det fluorescerande ämnet, dansylklorid, är bundet till de funktionella monomererna och en extern fluorescent ”quencher”, *p*-nitrobensaldehyd, användes för att studera inbindningen av templatet, L-tryptofan. I frånvaro av templatet binder ”quencher” in till avtrycken och fluorescensen släcks ut och vid inbindning byts detta ut mot templatet och fluorescensen från de molekyllära avtrycken ökar. Den ökande intensiteten på fluorescensen när målmolekylen binder till avtrycket ökar känsligheten men också specificiteten eftersom endast specifika bindningar genererar en sensorsignal. Med den här metoden kunde koncentrationer av L-tryptofan inom  $\mu\text{M}$  området detekteras. Det var också möjligt att skilja på D- och L-tryptofan, fluorescensintensiteten för D-tryptofan var 70 % av vad som erhöles för L-tryptofan .

*Scintillation och fluorescens*

Organiska scintillatorer har också inkorporerats i MIP-partiklar för att förstärka sensorsignalen.<sup>54, 55</sup> Som templat användes en  $\beta$ -adrenerg antagonist, (S)-propranolol och den scintillerande monomeren inkorporerades kovalent i polymeren under polymeriseringen. Genom att använda små MIP-partiklar var det möjligt att inkorporera det signalförstärkande ämnet, scintillerande fluor, i nära anslutning till bindingsställena i polymeren. När ett radioaktivt inmärkt templat binder till polymeren överförs dess strålningsenergi till det signalförstärkande ämnet vilket i sin tur genererar en fluorescerande signal. Radioaktivt inmärkta templat i provlösningen som inte har bundit till polymeren kommer inte att generera någon energiöverföring beroende på att de är för långt ifrån partiklarna. Den här metoden kan t.ex. användas vid kompetitiva bestämningar, där inbindningen av märkta templat inhiberas av omärkta templat. MIP-partiklarna i denna undersökning visade på en kiral igenkänning för templatet och dissociationskonstanten,  $K_D$ , var  $5,5 \times 10^{-6}$  M.

*”Quantum dots”*

I en metod som nyligen presenterades av Lin *et al.* har oorganiska halvledande nanopartiklar, ”quantum dots” inkorporerats i MIP-filmer för att öka känsligheten och selektiviteten.<sup>56</sup> När

---

<sup>51</sup> Kriz, D., Ramström, O., Svensson, A., Mosbach, K. *Introducing Biomimetic Sensors Based on Molecularly Imprinted Polymers as Recognition Elements*. *Anal Chem*, 67, 2142-2144 (1995).

<sup>52</sup> Chen, Y-C., Brazier, J. J., Yan, M., Bargo, P. R., Prahl, S. A. *Fluorescence-based optical sensor design for molecularly imprinted polymers*. *Sens Actua B*, 102, 107-116 (2004).

<sup>53</sup> Liao, Y., Wang, W., Wang, B. *Building Fluorescent Sensors by Template polymerization: The Preparation of a Fluorescent Sensor for L-Tryptophan*. *Bioorganic Chemistry* 27, 463-476 (1999).

<sup>54</sup> Ye, L., Mosbach, K. *Polymer Recognizing Biomolecules Based on a Combination of Molecularly Imprinting and Proximity Scintillation: A New Sensor Concept*. *J Am Chem Soc*, 123, 2901-2902 (2001).

<sup>55</sup> Ye, L., Surugiu, I., Haupt, K. *Scintillation Proximity Assay Using Molecularly Imprinted Microspheres*. *Anal Chem*, 74, 959-964 (2002).

<sup>56</sup> Lin, C. I., Joseph, A. K., Chang, C. K., Lee, Y. D. *Molecularly imprinted polymeric film on semiconductor nanoparticles Analyte detection by quantum dot photoluminescence*. *J Chromatogr A* 1027, 259-262 (2004).

templatet binder till polymerfilmen sker det en utsläckning av fotoluminiscensen från "quantum dots". Denna utsläckning orsakas troligtvis av en energiöverföring, "Fluorescence resonance energy transfer" (FRET), mellan "quantum dots" och templatet.

Flera olika ämnen har använts som templat t.ex. koffein, theofyllin, cystein och estriol. Dessa syntetiserades tillsammans med monomererna och som "quantum dots" användes en modifierad kromofor, CdSe/ZnS och 4-vinylpyridin. De syntetiska receptorerna jämfördes med kontrollpolymerer som tillverkats på liknande sätt men utan templat. Resultaten visade att de syntetiska bindningsställena hade störst affinitet för det ämne som använts som templat vid tillverkningen. Till exempel hade MIP tillverkade med koffein som templat, ca sex gånger lägre emissionsintensitet när koffein användes som analyt jämfört med när kontrollsubstanterna, theofyllin och theobromin användes som analyt. När kontrollpolymerer, utan avtryck, användes kunde ingen förändring av fotoluminiscensen registreras. I jämförelse med fluorescerande färgämnen har "quantum dots" flera fördelar t.ex. ett brett excitationsspektra, en bättre stabilitet för fotonedbrytning och de är inte beroende av hydrofoba lösningsmedel.



## 9 Sensorer baserade på MIP

I sensorapplikationer har MIP framför allt använts som syntetiska receptorer för små oorganiska molekyler. Exempel från litteraturen där MIP har använts i kombination med olika detektionsprinciper finns i appendix 1. Under de senaste åren har det publicerats allt fler artiklar där biologiska substanser utgjort templat vid framställningen av MIP. Flera av dessa avtryck har också använts som syntetiska receptorer i sensorer. I appendix 2 är några exempel upptagna där molekyllära avtryck av biologiska substanser kombinerats med olika detektionssystem. Här i rapporten ges en kort beskrivning av några av dessa exempel för att belysa vad som hittills uppnåtts i utvecklingen av sensorer baserade på MIP som igenkännande material för större substanser.

### *Dataoptimerade avtryck*

Chianella *et al.* har publicerat ett arbete där datoroptimerade molekyllära avtryck, se kap. 4.7, av toxinet microcystin-LR har använts både för att koncentrera toxinet i en provlösning och som syntetiska receptorer i en QCM-sensor.<sup>57</sup> Microcystin-LR är en cyklisk peptid som syntetiseras av en cyanobakterier och den består av sju aminosyror. Koncentreringen skedde genom fastfasextraktion med polymerpartiklar som var 38-63 µm. Polymerfilmerna på sensorytorna tillverkades av samma typ av partiklar som i fastfasextraktionen men med en mindre storlek, < 5 µm. Dessa partiklar hade separerats fram utifrån större fraktioner genom upprepad sedimentation i aceton. För att immobilisera partiklarna till sensorytorna och skapa en polymerfilm användes "spin-coating". Genom att använda MIP för både koncentrerings och detektion var det möjligt att mäta en toxinkoncentration på 0,35 nM.

Chianella *et al.* har i ett tidigare arbete jämfört bindningsegenskaperna mellan molekyllära avtryck, tillverkade genom datoroptimering och med microcystin-LR som templat, och antikroppar riktade mot toxinet, se tabell 2.<sup>56</sup> Resultaten indikerade att de polymera avtrycken hade en affinitet och känslighet som var jämförbar med polyklonala antikroppar. Detektionsområdet för microcystin-LR var bredare för MIP jämfört med de testade antikropparna.

**Tabell 2.** Jämförelse mellan affinitet och känslighetsområde för MIP och antikroppar riktade mot Microcystin-LR

Receptor	K <sub>D</sub> (nM)	Mätområde (µg L <sup>-1</sup> )
Datoroptimerade MIP	0,3	0,1-100
Monoklonala antikroppar	0,03	0,025-5
Polyklonala antikroppar	0,5	0,05-10

<sup>57</sup> Chianella, I., Piletsky, S. A., Tothill, I. E., Chen, B., Turner, A. P. F. *MIP-based solid phase extraction cartridges combined with MIP-based sensors for the detection of microcystin-LR*. Biosens Bioelectron, 18, 119-127 (2003).



### *Monomerer med disulfidbindning*

Lin *et al.* har som templat använt två lågmolekylära peptider med 9 aminosyror, oxytocin och vasopressin, för att utveckla en peptidsensor.<sup>58</sup> De molekylära avtrycken tillverkades i ett polärt lösningsmedel, vatten/acetone, direkt på guldytor och interaktionen mellan peptiderna och MIP studerades med hjälp av QCM. En tvärbindande monomer med en disulfidbindning, (N-Acr-L-Cys-NHBn)<sub>2</sub>, designades för att fästa polymeren på sensorytan. Den designade monomer immobiliserades först till guldytan och därefter syntetiserades polymerfilmen till ytan i närvaro av templatet. För att utvärdera avtryckens ospecifika bindning användes peptider med liknande längder. Resultaten visade att K<sub>D</sub>-värdena för oxytocin och vasopressin var generellt 10-100 gånger högre än för de peptider som inte används som templat. K<sub>D</sub> för vasopressin var 2,0 x 10<sup>-8</sup> M och för oxytocin 1,1 x 10<sup>-8</sup> M.

### *"Photo-grafting"*

I en nyligen publicerad rapport beskrivs en "photo-grafting"-metod där tunna polymerfilmer syntetiserades direkt på guldchips anpassade för ett SPR-baserat analysinstrument, Biacore 3000<sup>TM</sup>.<sup>21</sup> Guldytan funktionaliserades först med en fotokänslig radikalinitiator, cyanovaleriansyra, och därefter tillsattes en förpolymeriserad lösning bestående av templatet domoic acid, DA, och monomererna. Chipet belystes därefter med UV-ljus vilket resulterade i att en kovalent bunden polymerfilm formades på guldytan. Kontaktvinkelmätningar och AFM användes för att karakterisera polymerfilmens struktur. Dessa visade att filmen var homogent immobiliserad till sensorytan och att filmtjockleken var omkring 40 nm. Eftersom DA är en liten molekyl, MW 311, användes ett konjugat av DA och ett enzym för att analysera polymerfilmens bindningsegenskaper. De molekylära avtryckens känslighet för DA jämfördes med monoklonala antikroppar affinitet för aminosyran.

Resultaten visade att detektionsnivån hos MIP var ungefär 3 gånger högre än hos anti-kropparna, 5 µg l<sup>-1</sup> respektive 1,8 µg l<sup>-1</sup>. De molekylära avtrycken visade på en högre stabilitet. Ingen skillnad av signalen kunde observeras efter 30 regenereringar till skillnad från anti-kropparna som förlorade i stabilitet redan efter 5 regenereringar.

### *Stämplingsteknik*

Dickert *et al.*<sup>46, 59, 60, 61</sup> har framställt en MIP-baserad QCM-sensor för detektion av jästceller, *Saccharomyces cerevisiae*, virus, Tobacco mosaic virus (TMV), och enzymet lysozyme med hjälp av stämplingsteknik, se avsnittet MIP-format.

### *"Spincoating" av polymermatris*

En metod för tillverkning av tunna polymerfilmer där det polymeriserande steget är borttaget har beskrivits av Sneshkoff *et al.*<sup>62</sup> Avtrycken framställdes i en lösning där templatet,

---

<sup>58</sup> Lin, C-Y., Tai, D-F., Wu, T-Z. *Discrimination of Peptides by Using a Molecularly imprinted Piezoelectric Biosensor*. Chem Eur J, 9, 5107-5110 (2003).

<sup>59</sup> Dickert, F. L., Hayden, O., Halikias, K. P. *Synthetic receptors as sensor coatings for molecules and living cells*. Analyst, 126, 766-771 (2001).

<sup>60</sup> Hayden, O., Bindeus, R., Haderspöck, C., Mann, K-J., Wirl, B., Dickert, F. L. *Mass-sensitive detection of cells, viruses and enzymes with artificial receptors*. Sens Actua B, 91, 316-319 (2003).

<sup>61</sup> Dickert, F. L., Hayden, O., Bindeus, R., Mann, K-J., Blaas, D., Waigmann, E. *Bioimprinted QCM sensors for virus detection-screening of plant sap*. Anal Bioanal Chem, 378, 1929-1934 (2004).

L-glutamin, blandades med en färdig polymermatris av nylonpellets. Aminosyran inkorpore-  
rades i nylonets nätverk när det luckrades upp och runt aminosyran bildas vätebindningar.  
Polymerfilmen framställs därefter genom ”spin coating” eller ”drop coating” av lösningen  
med de färdiga avtrycken. Polymerfilmerna hade en kiral specificitet för aminosyran och  
effektiviteten var oförändrad efter fem regenereringscykler.

### *Elektropolymerisering*

Molekylära avtryck av aminosyror har även tillverkats genom elektropolymerisering. Liao  
*et al.*<sup>63</sup> har använt L-histidin och D-histidin som templat för tillverkning av polymerfilmer på  
guldelektroder. Elektropolymeriseringen utfördes genom att använda cyklisk voltametri, CV,  
i en polymerlösning, akrylamid, N, N'-metylenbisakrylamid, med templatet. En filmtjocklek  
på 135 nm och 140 nm erhöles vid 20 respektive 30 cykler av elektropolymerisering. Karakte-  
riseringar med AC impedansspektroskopi och piezoelektrisk kvartskristallteknik visade att  
polymerfilmerna selektivt kunde återbinda respektive templatmolekyl. Till exempel visade  
frekvensförändringar på kvartskristaller modifierade med molekylära avtryck av L-histidin en  
frekvensskillnad på ca 200  $-\Delta f/\text{Hz}$  när 2 mM L-histidin användes som analyt jämfört med 2  
mM D-histidin.

---

<sup>62</sup> Sneshkoff, N., Crabb, K., BelBruno, J. J. *An Improved Molecularly Imprinted Polymer Film for Recognition of Amino Acids*. J Appl Polym Sci, 86, 3611-3615 (2002).

<sup>63</sup> Liao, H., Zhang, Z., Nie, L., Yao, S. *Electrosynthesis of imprinted polyacrylamide membranes for the stereospecific L-histidine sensor and its characterization by AC impedance spectroscopy and piezoelectric quartz crystal technique*. J Biochem Biophys Methods, 59, 75-87 (2004).



## 10 Summering och diskussion

Trots de stora satsningarna som hittills gjorts återstår mycket arbete för att utveckla MIP-teknologin till full användbarhet i sensorapplikationer. Affiniteten för MIP är i de flesta fall mycket lägre än den hos antikroppar.<sup>64</sup> Hittills har de molekylära avtrycken generellt uppvisat bättre bindningsegenskaper för mindre molekyler men arbeten har också publicerats där affiniteten är jämförbar med polyklonala antikroppar och endast en tiopotens lägre än för monoklonala antikroppar.<sup>36</sup> Fördelar och nackdelar med MIP sammanfattas i tabell 3.<sup>65</sup>

Den största fördelen är MIP höga stabilitet. Beroende på det stora inslaget av tvärbindande molekyler så blir polymerens struktur stabil och robust vilket gör det möjligt att regenerera dessa receptorer med omilda metoder t.ex. syror, baser, organiska lösningsmedel, höga temperaturer och tryck utan att påverka bindningsegenskaperna. Polymererna är dessutom billiga att producera och de kan lagras torrt vid rumstemperatur under längre perioder vilket gör att de är intressanta som igenkänningsmaterial i sensorer. En annan kvalitet är möjligheten att specialtillverka MIP för ämnen som det kan vara svårt att framställa antikroppar mot t.ex. ämnen som inte ger något immunologisk svar och/eller toxiska ämnen såsom toxiner. De molekylära avtrycken kan också användas för att koncentrera det ämne som ska detekteras i provet. Provet kan passera en kolonn med MIP före det injiceras till en sensoryta med samma avtryck vilket gör att känsligheten kan ökas.

**Tabell 3.** Fördelar och nackdelar med MIP.

<b>MIP Fördelar</b>	<b>MIP Nackdelar</b>
Hög kemisk, fysisk och termisk stabilitet	I jämförelse med antikroppar är affiniteten generellt lägre
Kan användas i polärt och opolärt lösningsmedel	Heterogena bindningsställen, distribution av bindningsställen med olika affinitet
Kan tillverkas i olika format, partiklar och filmer	I de flesta metoder krävs det stor mängd av templet
Syntes, inga djurförsök	Specifika protokoll måste tas fram för varje målmolekyl
Tid för preparation är snabb	
Kostnadseffektivt alternativ till biomolekylbaserad detektion	
Kan lagras längre tider	

De första patenten inom området kom i mitten på 1990-talet och sedan dess har antalet ökat och idag finns det ungefär 50 stycken. I början innehöll dessa patent skydd för metoder för att tillverka MIP, men på senare år har patent som inkluderar möjligheterna att använda dessa syntetiska receptorer i sensorapplikationer ökat kraftigt. Uppgifterna är hämtade från data-

<sup>64</sup> Weller, M. G., *Immunochromatographic techniques-a critical review*. Fresenius' J Anal Chem, 366, 635-645 (2000).

<sup>65</sup> Mahony, J. O., Nolan, K., Smyth, M. R. Mizaikoff, B. *Molecularly imprinted polymers-potential and challenges in analytical chemistry*. Anal Chim Acta, 534, 31-39 (2005).

baserna USPTO <sup>66</sup> och EP-espacenet <sup>67</sup> och i appendix 3 ges några exempel på patent där MIP syntetiserats för sensorapplikationer.

För att förbättra bindningsegenskaperna hos MIP krävs det en bättre förståelse för de mekanismer som främjar selektiviteten på en molekylär nivå. Metodik där t.ex. bindningsställenas densitet och homogenitet kan kontrolleras skulle öka reproducerbarheten vid syntesen av polymerfilmer. Genom att tillverka de molekylära avtrycken i filmer och nanopartiklar kan också problem med masstransport av målmolekylen till och från polymermatrisen minskas eftersom bindningsställena exponeras nära eller på polymerens yta. Det är också en fördel ur detektionssynpunkt att polymerfilmerna är tunna. Vid vissa optiska detektioner som SPR sträcker sig det elektromagnetiska fältet, inom vilket det är möjligt att mäta inbindningar och dissociationer, endast några hundra nanometer från sensorytan. Detta innebär att för tjockare polymerfilmer hamnar bindningsställena utanför detta fält och att interaktionerna inte kan registreras.

Utvecklingen av nya metoder för att tillverka MIP kommer sannolikt att förbättra deras känslighet och specificitet, vilket ökar potentialen att använda dessa som igenkänningsmaterial i sensorer. Genom en kontrollerad syntes av MIP kan tunna filmer med bestämd tjocklek och bra kontakt med sensorytan tillverkas. Sensorytorerna kan miniaturiseras och flera ytor med olika molekylära avtryck kopplas samman för realtidsdetektion av ett stort antal ämnen samtidigt. Detta innebär att de olika målmolekylernas specifika bindningsmönster till dessa ytor har lagrats i ett bibliotek, så att analysen av sensorsignalerna från provlösningen kan ske momentant vid detektionen. En viktig aspekt är också att den relativt lägre affinitet som MIP uppvisar för målsubstanserna i jämförelse med antikroppar kan kompenseras genom att använda multivariata analysmetoder. Det vill säga att ifall interaktionerna ger specifika bindningsmönster behöver inte affiniteten vara hög.

Utifrån denna litteraturstudie är bedömningen att funktionalisering av sensorytorer med molekylära avtryck kan vara en möjlig väg att producera stabila och specifika igenkänningsmaterial för biosensorer. Tunna filmer kan syntetiseras direkt på sensorytan genom friradikalpolymerisering och det finns flera lovande tekniker som är under utveckling. Till exempel har stämplingstekniken och ”photografting” använts för tillverkning av MIP-filmer för biologiska templat som aminosyror, proteiner och virus. Med stämplingsteknik kan mängden templat vid tillverkningen av de molekylära avtrycken reduceras. Det är också möjligt att orientera de immobiliserade målsubstanserna på stämpelytan vilket innebär att homogeniteten på de polymera avtrycken kan öka. <sup>59</sup> En fördel med ”photografting” är att tunna och homogena filmer kan produceras på sensorytan eftersom huvuddelen av syntesen sker nära ytan där fotoinitiatorn är kovalent bunden.

Vi är intresserade av att tillverka polymera avtryck av biologiskt material som toxiner och bakterier. Vi kommer därför att prova en syntesmetod som involverar självansamling genom icke kovalenta bindningar och UV-initiering. Interaktioner genom icke kovalenta bindningar efterliknar mer naturliga bindningar där interaktionen är svag. Genom att använda UV-initiering kan temperaturen hållas låg och reaktionshastigheten långsam vilket är en fördel för att jämvikten mellan templat och monomer ska uppnås. En fördel med friradikalpolymerisering är att det finns ett stort urval av kommersiellt tillgängliga funktionella och tvär-

---

<sup>66</sup> US Patent & Trademark Office, URL <<http://www.uspto.gov>>

<sup>67</sup> URL <<http://www.espacenet.com>>

bindande monomerer vilket gör att kostnaden för tillverkningen av polymeren kan hållas nere.

Vi kommer att testa optiska och masskänsliga metoder som signalöverföringssystem i kombination med polymerfilmer. Dessa metoder har hög känsligheten, stabilitet, möjlighet att miniaturiseras och tillverkningen kan ske till en relativt låg kostnad. Med dessa tekniker kan metallytor som Si och Au användas som sensorytor och polymerfilmen kan förankras till ytan med kända metoder för att binda molekyler till ytor. Till exempel kan ett linkersystem baserat på aminoalkylsilaner eller tiooler användas på Si respektive Au för att fästa polymeren till ytan. Beroende på polymerens kemiska sammansättning kan den andra änden på linkern modifieras så att den binder till polymeren med kovalenta bindningar via amin-, thiol- eller aldehyd-grupper.

Genom att kombinera MIP med multivariata analysmetoder samt billiga och effektiva signalöverföringssystem kan dessa sensorer beroende på deras höga stabilitet ha stor potential att utgöra sensorelement för komplexa biologiska prover.

## Tack

Ett stort tack till; Per Ola Andersson och Lars Juhlin för värdefulla synpunkter på rapportens innehåll. Åsa Lundvall för bildmaterial och redigering av manuskriptet. Kerstin Granström, Berit Forsberg och Lena Blomgren för litteratursökning och underlag till rapporten. Calle Nilsson för granskning av rapporten.



Exempel där MIP-filmer immobiliserade på sensorytor använts för detektion av oorganiska ämnen

Templat	Detektion	Monomerer	MIP-format	Mätområde/ känslighet	Ref
	<b>Optisk</b>				
Sialic acid	SPR	<i>N,N,N</i> -trimethylaminoethyl methacrylate, <i>p</i> -vinylbenzeneboronic acid ester, sialic acid, HEMA, EGDMA, 2,2'-azobis(dimethylvaleronitrile)	Film Sandwichteknik	0,1-1,0 mg/ml (för GM <sub>1</sub> )	68
Chloropyrifos-methyl, Diazinon Glyphosate (Pesticider)	Luminiscens	Styrene, DVB, AIBN, Europium (III) oxide	Film "Dip-coated" på optisk fiber	100 ppm-5 ppt, Känslighet, 5-9 ppt b.p. (pesticid)	69
NADH	SPR	Acrylamide, acrylamidophenyl-boronic acid	Film, 130 nm "Drop-coated"	10 <sup>-5</sup> -10 <sup>-3</sup> M	70
Theophylline Caffeine, Xanthine	SPR	MAA, EDGMA, AIBN	Partiklar, "Drop-coated" Film, 5-10 nm	0,4-6 mg/ml (theophylline)	71
( <i>R,R</i> )- och ( <i>S,S</i> )-2,3-di- <i>O</i> -benzoyl-tartronic acid	RIFS	<i>N,N'</i> -Diethyl-4-vinyl-benzamide, ethylene-dimethacrylate, di- <i>O</i> -benzoyl-tartaric acid, AIBN	Film, <100 nm "Spin-coated"	Kiral separation, $\alpha =$ 1,2	42

<sup>68</sup> Kugimiya, A., Takeuchi, T. *Surface plasmon resonance sensor using molecularly imprinted polymer for detection of sialic acid*. Biosens Bioelectron, 16, 1059-1062 (2001).

<sup>69</sup> Jenkins, A. L., Yin, R., Jensen, J. L. *Molecularly imprinted polymer sensors for pesticide and insecticide detection in water*. Analyst, 126,798-802 (2001).

<sup>70</sup> Raitman, O. A., Arslanov, V. V., Pogorelova, S. P., Kharitonov, A. B. *Molecularly Imprinted Polymer Matrices for Analysis of the Cofactor NADH: A Surface Plasmon Resonance Study*. Dokl Phys Chem, 392, 256-258 (2003).

<sup>71</sup> Lai, E. P. C., Fafara, A., VanderNoot, V. A., Kono, M., Polisky, B. *Surface plasmon resonance sensors using molecularly imprinted polymers for sorbent assay of theophylline, caffeine and xanthine*. Can J Chem, 76, 265-273 (1998).



Templat	Detektion	Monomerer	MIP-format	Mätområde/ känslighet	Ref
	<b>Elektrokemisk</b>				
Morphine	Ström	MAA, EGDMA, AIBN	Partiklar, 1-25 µm	0,1-10 µg/ml Känslighet 0,05 µg/ml	72
Atrazine	Konduktans	MAA, TEDMA, OUA, AIBN	Film, 60-120 µm Sandwichteknik	5 nM	73
Desmetryn (Herbicide)	Kapacitans	AMPS, MBA, benzophenone	Film, ≈10 nm ”Photo-grafted”	1-7 mM K <sub>A</sub> 4,3 mM <sup>-1</sup>	45
Creatinine (Metabolit av creatine)	Kapacitans	AMPS, MBA, benzophenone	Film, ”Photo-grafted”	10-600 µM Känslighet, 10 µM	74
Thiophenol, <i>para</i> - nitrothiophenol	ISFET	Titanium(IV)butoxide, titanium(IV)phosphonate	Film, 117 nm ”Drop-coated”	1 x 10 <sup>-6</sup> - 5 x 10 <sup>-4</sup> M	75
Albuterol (B-agonist)	Voltametrisk	Polynorbomene, Trimethylolpropane trimethacrylate, benzoin	Film ”Spin coated”	10 <sup>-2</sup> -10 <sup>-6</sup> M	76

<sup>72</sup> Kriz, D., Mosbach, K., *Competitive amperometric morphine sensor based on an agarose immobilized molecularly imprinted polymer*. Anal Chim Acta, 300, 71-75 (1995).

<sup>73</sup> Sergeeva, T. A., Piletsky, S. A., Brovko, A. A., Slinchenko, E. A., Sergeeva, L. M., Panasyuk, T. L., El'skaya, A. V. *Conductometric sensor for atrazine detection based on molecularly imprinted polymer membranes*. Analyst, 124, 331-334 (1999).

<sup>74</sup> Panasyuk-Delaney, T., Mirsky, V. M., Wolfbeis, O. S. *Capacitive Creatinine Sensor Based on a Photografted Molecularly Imprinted Polymer*. Electroanalysis, 14, 221-224 (2002).

<sup>75</sup> Pogorelova, S. P., Kharitonov, A. B., Willner, J., Sukenik, C. N., Pizem, H., Bayer, T. *Development of ion-sensitive field-effect transistor-based sensors for benzylphosphonic acids and thiophenols using molecularly imprinted TiO<sub>2</sub> films*. Anal Chim Acta, 504, 113-122 (2004).

<sup>76</sup> Huang, H. C., Lin, C. I., Joseph, A. K., Lee, Y. D. *Photo-lithographically impregnated and molecularly imprinted polymer thin film for biosensor application*. J. Chromatogr A, 1027, 263-268 (2004).

Templat	Detektion	Monomerer	MIP-format	Mätområde/ känslighet	Ref
	<b>Masskänslig</b>				
S-propranolol B-blockerare läkemedel	QCM	TRIM, MAA, AIBN	Film Sandwichteknik	Kiral separation 50 µM	48
Niacinamide, (Nicotinamide)	QCM	MAA, EGDMA, AIBN	Partiklar, 0,05-1,5 µm ”Drop-coated”	$5 \times 10^{-9} - 5 \times 10^{-6}$ M $K_{D1} \approx 2$ mM, $K_{D2} \approx 0,8$ mM	43
Nukleotides AMP, GMP, CMP	ISFET QCM	Acrylamide, 3-(acrylamido)phenylboronic acid, N,N'-methylenebisacrylamide, N,N,N',N'- tetramethylethylenediamine	Film, 360 Å ”Drop-coated” TiO2 membran	AMP, $1 \times 10^{-5}$ M GMP, $1 \times 10^{-5}$ M CMP, $8 \times 10^{-7}$ M	77
Sorbitol	QCM	<i>o</i> -phenylenediamine	Film Elektrosynt. CV	1-15 mM	78
Phenobarbital	BAW	MAA, EGDMA, AIBN	Partiklar $\approx 1$ µm ”Spin-coated”	$9 \times 10^{-8} - 5 \times 10^{-5}$ M Detektionsgräns $5 \times 10^{-8}$ M	79

2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA), Ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA), Trimethylolpropane trimethacrylate (TRIM), Tri(ethylene glyco)ldimethacrylate (TEDMA), Azo-bis(isobutyronitrile) (AIBN), Azobis(2,4-dimethylvaleronitrile) (ABDV), 2-Acrylamido-2-methyl-1-propane sulfonic acid (AMPS), N,N-methylenediarylamide (MBA), Oligourethane acrylate (OUA), Divinyl benzene (DVB), Methacrylic acid (MAA), Adenosine 5'-monophosphate (AMP), Guanosine 5'-monophosphate (GMP), Cytosine 5'-monophosphate (CMP), Cyklisk voltametri, (CV), Separationsfaktor, ( $\alpha$ ), Bulk acoustic wave (BAW), Quartz crystal microbalance (QCM), Reflectometric interference spectroscopy (RIFS)

<sup>77</sup> Zayats, M., Lahav, M., Kharitonov, A. B., Willner, I. *Imprinting of specific molecular recognition sites in inorganic and organic thin layer membranes associated with ion-sensitive field-effect transistors*. Tetrahedron, 58, 815-824 (2002).

<sup>78</sup> Feng, L., Liu, Y., Tan, Y., Hu, J. *Biosensor for the determination of sorbitol based on molecularly imprinted electrosynthesized polymers*. Biosens Bioelectron, 19, 1513-1519 (2004).

<sup>79</sup> Peng, H., Liang, C., He, D., Nie, L., Yao, S. *Non-aqueous assay system for phenobarbital using biomimetic bulk acoustic wave sensor based on a molecularly imprinted polymer*. Anal Lett, 33, 793-808 (2000).



Exempel där MIP-filmer immobiliserade på sensorytor använts för detektion av biologiska ämnen

Templat	Detektion	Monomerer	MIP-format	Mätområde/ känslighet	Ref
<i>Aminosyror</i>					
L-glutamine	FTIR	Nylon-6 pellets	Film, 1 µm -500 nm "Spin-coated"	Kiral specificitet	62
Phenylalanin	Kapacitans	Phenol	Film, 90 nm Elektropolymeriserad/CV	0,5-8 mg/ml	80
L- D- Histidine	AC impedans spektroskopi, PQC	Acrylamide, N, N'- methylenebisacrylamide	Film, 135-140 nm Elektropolymeriserad/CV	Kiral specificitet (1 mM)	63
Domoic acid, DA	SPR	2-(diethylamino) ethyl methacrylate, N,N'-methylenebisacrylamide, 4,4'- azo-bis (cyanovaleric acid)	Film, 40 nm "Photo-grafted"	5 µg <sup>l</sup> <sup>-1</sup>	21
<i>Peptider</i>					
Oxytocin Vasopressin	QCM	Acrylic acid, acrylamide, N- benzylacrylamide, (N-Acr-L-Cys-NHBn) <sub>2</sub>	Film, 92 nm Sandwichteknik	K <sub>D</sub> 1-2 x 10 <sup>-8</sup> M	58
<i>Proteiner</i>					
Lysozyme (Enzym)	QCM	Styrene, DVB, methacrylic acid, AIBN	Film Stämpling	(Använt 4 mg/ml)	60

<sup>80</sup> Panasyuk, T. L., Mirsky, V. M., Piletsky, S. A., Wolfbeis, O. S. *Electropolymerized Molecularly Imprinted Polymers as Receptor Layers in Capacitive Chemical Sensors*. Anal Chem, 71, 4609-4613 (1999).

Templat	Detektion	Monomerer	MIP-format	Mätområde/ känslighet	Ref
<b>Celler</b>					
Jästceller	QCM	4,4'-diisocyanatodiphenylmethane, triisocyanatobisphenol A, 4,4'-diaminodiphenyl ether	Film, (djup avtryck ≈ 1 μm) Stämpling	10 <sup>-4</sup> - 10 <sup>9</sup> celler/ml	46 59
<b>Toxiner</b>					
Microcystin-LR (Cyanobakterie)	QCM	AMPSA, UAEE, EGDMA, 1,1'-azo- bis(cyclohexane-carbonitrile)	Partiklar, < 5 μm "Spin-coated"	Detektionsgräns, 0,35 nM	57
<b>Virus</b>					
Tobacco mosaic virus (TMV)	QCM	p,p'-diisocyanatodiphenylmethane, triisocyanate, bisphenol A	Film, 200 nm Stämpling	Detekterat inom, ≈ 100 ng/ml - 1 mg/ml	60 61

2-Acrylamido-2-methyl-1-propanesulfonic acid (AMPSA), Ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA), Tetramethylbenzidine (TMB), Poly(vinyl chloride) (PVC), Tetraethoxysilane (TEOS), Titanium<sup>IV</sup> ethylate (TE), Imidazole-4-acrylic acid ethyl ester (UAEE), Divinylbenzene (DVB), Quartz crystal microbalance (QCM), Piezoelectric quartz crystal (PQC), Kapacitetfaktor (*k'*), Separationsfaktor ( $\alpha$ ).

Exempel på patent som inkluderar MIP och sensorapplikationer. Uppgifterna är hämtade från patentdatabaserna USPTO<sup>66</sup> och EP-espacenet<sup>67</sup>

Titel	Område	Innovatör	Uppdragsinnehavare / Sökande	Patent nr
Molecularly imprinted materials, method for their preparation and devices employing such materials	Metod för att tillverka polymerfilmer på Si-tytor genom ”spincoating”. Polymerfilmen kan användas som igenkänningsmaterial i sensorer.	Yan, M., <i>et al.</i>	Advanced Microbotics Corporation (USA)	US 5,587,273 1996
Highly selective chemical sensor	Sensor, baserad på MIP och en masskänslig signalöverföring.	Lipskier, J-F.	Thomson-CSF (FR)	US 5,910,286 1999
Imprinting large molecular weight compounds in polymer composites	Metod där MIP tillverkas i gränssytan mellan organiskt lösningsmedel och en vattenfas. Som templat används stora biomolekyler. Polymermaterialet kan användas som sensor element.	Singh, W. P. <i>et al.</i>	Lynntech, Inc. (USA)	US 6,582,971 2003
Polymeric food spoilage sensor	Sensor baserad på en polymer som innehåller ett metallkomplex. Vid inbindning av templat sker en färgförändring som kan detekteras optiskt.	Kelly, C. A. <i>et al.</i>	The Johns Hopkins University (USA)	US 6,593,142 2003
Molecularly imprinted polymers solution anion sensor	Sensor baserad på en polymer som innehåller en luminiscent lanthanide jon och optisk detektion.	Murray, G. M.	The Johns Hopkins University (USA)	US 6,749,811 2004
Molecularly imprinted polymers grafted on solid supports	Metod för tillverkning av MIP filmer. Polymeriseringen sker direkt på en ytan där en initiator först immobiliserats. De molekylära avtrycken kan t.ex. användas som igenkänningsmaterial i sensorer.	Sellergren, B. <i>et al.</i>	MIP Technologies AB (SE)	US 6,759,488 2004
Molecular recognition sensor system	Sensor baserad på en halvledande polymerfilm som sväller vid inbindning av templatet och en elektrokemisk detektion.	Williams, J. R. <i>et al.</i>	The Charles Stark Draper Laboratory, Inc. (MA)	US 6,807,842 2004

Titel	Område	Innovatör	Uppdragsinnehavare / Sökande	Patent nr
Sensor having molecularly imprinted polymers	Sensor baserad på MIP och elektrokemisk detektion för identifiering och separation av stora molekyler, bakterier och virus. Polymeren immobiliseras på en elektrodyta.	Gonzalez-Martin, A., <i>et al.</i>	Correspondence; Streets & Steele (US)	US 2004126814 2004
Food pathogen sensor using molecularly imprinted polymers	Sensor baserad på MIP och optisk detektion. De molekylära avtrycken fluorescerar i frånvaro av templat och vid inbindning släcks fluorescensen.	Freeman, C. J. och Glasel, J. A.	Correspondence; Patrick, R. S. (US)	US 2004106162 2004
Biological warfare sensor using molecularly imprinted polymers	Sensor för biologiska stridsmedel där MIP immobiliserats på ytan av en "transducer" som kan t.ex. vara QCM.	Freeman, C. J. och Glasel, J. A.	Sensor res and dev corp. (US)	WO 03104810 2003