

nal Chem, 2010, 82(4): 1556-1563.

- [17] Ostatna V, Vaisocherova H, Homola J, et al. Effect of the immobilisation of DNA aptamers on the detection of thrombin by means of surface plasmon resonance[J]. Anal Bioanal Chem, 2008, 391(5): 1861-1869.
- [18] Wang Z, Wilkop T, Xu D, et al. Surface plasmon resonance imaging for affinity analysis of aptamer-protein interactions with PDMS microfluidic chips[J]. Anal Bioanal Chem, 2007, 389(3): 819-825.
- [19] Rajendran M, Ellington AD. Selection of fluorescent aptamer beacons that light up in the presence of zinc[J]. Anal Bioanal Chem, 2008, 390(4): 1067-1075.
- [20] Yao C, Qi Y, Zhao Y, et al. Aptamer-based piezoelectric quartz crystal microbalance biosensor array for the quantification of IgE[J]. Biosens Bioelectron, 2009, 24(8): 2499-2503.
- [21] Levy M, Cater SF, Ellington AD. Quantum-dot aptamer beacons

for the detection of proteins[J]. ChemBiochem, 2005, 6(12): 2163-2166.

- [22] Liu J, Lee JH, Lu Y. Quantum dot encoding of aptamer-linked nanostructures for one-pot simultaneous detection of multiple analytes[J]. Anal Chem, 2007, 79(11): 4120-4125.
- [23] Wernet DP, Liu JW, Bohn PW, et al. Functional-DNA-Based nanoscale materials and devices for sensing trace contaminants in water[J]. MRS Bull, 2008, 33(1): 34-41.
- [24] Liu JW, Lu Y. Fast colorimetric sensing of adenosine and cocaine based on a general sensor design involving aptamers and nanoparticles[J]. Angew Chem Int Edit, 2006, 45(1): 90-94.
- [25] Wang YL, Li D, Ren W, et al. Ultrasensitive colorimetric detection of protein by aptamer-Au nanoparticles conjugates based on a dot-blot assay[J]. Chem Commun, 2008, (22): 2520-2522.

(收稿日期: 2010-05-10)

• 综 述 •

MALDI-IMS 直接组织分析

黄礼玲¹, 邹同祥², 眭维国¹, 陈洁晶, 吴润强, 费桂英 综述, 戴 勇[△] 审校

(1. 中国人民解放军第 181 医院, 广西桂林 541002; 2. 广西师范大学生命科学学院, 广西桂林 541004)

关键词: 光谱法, 质量, 基质辅助激光解吸电离; 组织; 病理学; 原位蛋白组学

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2011. 04. 018

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)04-0470-03

在生物医学研究中, 新的生物标志物的发现和新药物的研发, 需要灵敏、高通量、全面、快速的分析技术。利用基质辅助激光解吸电离成像质谱(matrix-assisted laser desorption ionization imaging mass spectrometry, MALDI-IMS)技术, 直接分析生物组织切片, 对组织中化合物的组成、相对丰度及分布情况进行高通量、全面、快速的分析, 通过所获得的目标物质的分布信息, 发现生物标志物和监控化合物, 该技术可用于组织病理特征观察、疾病诊断、药物疗效监测以及生物标志物发现等。

1 组织切片蛋白的原位分析

使用成像质谱仪, 必要的组成部分包括自动光栅元件、自动数据获取系统和可视化软件。近来, 几乎所有的厂家都发展了与其仪器相关的内部软件, 并为这些仪器和图像重建系统装置了驱动程序。根据样本切片产生的离子的不同, 质谱成像仪可分为几类: 一类是通过脉冲激光照射, 一类是通过高能粒子的粒子辐射。以激光为基础的系统包括 MALDI 和激光解吸附离子化仪器。二次离子质谱(secondary ion mass spectrometry, SIMS)系统通过连续的高度集中的高能粒子束攻击。一般来说, 这些成像仪器大部分利用 MALDI-飞行时间(MALDI-time of flight, MALDI-TOF)、MALDI-TOF/TOF 和 TOF-SIMS。MALDI-TOF 成像仪器具有高通量的特点, TOF-SIMS 成像仪器能提供亚微米的空间分辨率^[1]。这 2 个成像仪器在质谱成像方面都具有强有力的优点。本综述主要讨论 MALDI-IMS。

2 组织样本采集和制备

在整个样本采集、制备、质谱成像和最后的解释等过程中, 都要保持样本的化学代表性和空间完整性^[2]。避免在样本制

备过程中造成被分析化合物的降解和空间移位, 防止冰晶形成; 避免切片打卷、起皱褶, 选择适宜的切片厚度等。冷冻的组织在恒温冷冻切片机上进行切割, 切割平台的温度根据组织类型保持在 -5~-25℃ 之间。切片厚度一般在 10~20 μm, 以保证质谱分析时被分析物足够的组分浓度^[3]。

3 切片的 MALDI 的基质应用

大量的被分析物所选用的不同分子大小基质都凭经验来选择。对于组织分析, 常用的基质芥子酸(SA)、α-氰基-4-羟基肉桂酸(HCCA)和 2,5-二羟基苯甲酸(DHB)。SA 能为高分子量的蛋白提供最好的信号, HCCA 则主要应用于多肽和低分子量蛋白, DHB 则适用于小分子药物的信号获取。基质覆盖通常有两种方法: 斑点法和喷雾法。喷雾法是在可控条件下振荡蒸发产生基质微粒, 然后轻柔的覆盖于组织样品之上。在此过程中, 尽可能满足以下条件: 组织切片上的被分析物无扩散或移位; 质谱成像的分辨率必须应大于共结晶的尺寸; 基质与被分析物形成良好的共结晶。基质浓度主要影响结晶的覆盖率。通常 SA 的浓度以 10~30 mg/mL 为宜。将喷好基质的组织切片放在室温下, 待溶剂挥发析出结晶后放入干燥器中干燥 2 h。

4 切片组织学染色和 MALDI-IMS

先进的 MALDI-IMS 软件可以在进行 MALDI 操作之前, 完成 MALDI 图像和宏观或显微光学图像的叠加。

为正确解释 MALDI-IMS 结果, 必须联系切片组织学信息。相邻的 2 张切片中, 取 1 张用于苏木精-伊红(HE)染色, 因为这种染色方法可以获得更多的组织学信息, 如可以将切片中巨大的侵入性肿瘤区与大区域的结缔组织区组织特征显著的区别开来。并为后续的解释提供一定的分子信息。近来, 报

△ 通讯作者, E-mail: daiyong22@yahoo.com.cn。

道了一种新的方法:即在完成 MALDI 检测以后再将该切片进行 HE 组织学染色^[4-5]。

5 成像数据分析和可视化

在完成 MALDI-IMS 操作后,会收集到海量的质谱信息。这是这个方法的优点,但同时也带来了一定的限制因素,因为这些数据的处理时非常费时。很多方便有效的数据处理工具应运而生。利用不同的可视化处理策略,可快速地将获得的信息转化为可视化的图像,进而了解不同疾病病症。这包括对感兴趣区域的分析、尺度的选择(颜色调节,线性/对数),图像覆盖、光谱的划分、改进图像数据的信号与噪声、剖面强度(随时间和空间的强度变化)和被分析物的化学库鉴定等^[6]。成像质谱发展了一系列的工具,继而提高了从大量数据中提取有用数据的质量,减少了实际数据的范围,为不同质谱图像的对齐和比较提供了可能。

利用软件将选定质量、质量范围或重叠在显微图像上的质谱群的强度分布可视化,分析不同种类生物分子的空间分布,如多肽、蛋白或小分子等。峰的强度可用色彩饱和度来表示。有一些专业软件,可通过组织生物标志物的多变量统计分析,自动化分类组织的分子状态。

6 蛋白质的鉴定

组织中不同的肽和蛋白质的鉴定,可以增加我们对于一些未研究得很清晰的疾病的了解。处理所质谱并确定其统计学意义和 m/z 种类,这些 m/z 种类显著表示受疾病调节表达的多肽和蛋白质种类。鉴定策略必须根据特殊样本的复杂性、蛋白质丰度或蛋白分子量而有所改变。一般有 2 种蛋白质鉴定方法:一种是自上而下的鉴定方法,这种方法包括在质谱仪中得到的感兴趣蛋白的离子化和气相碎片;另一种是自下而上的方法,这种方法利用质谱鉴定利用蛋白酶消化蛋白得到的肽段,经常会包含有其他的蛋白水解碎片^[7-8]。最终得到的质谱,利用相应的序列模式在理论蛋白/多肽数据库中的进行检索。检索通过利用诸如 MASCOT 和 SEQUEST 常规算法软件来完成。

7 利用 MALDI-IMS 的组织分析

大多数的 MALDI-IMS 应用于研究人类和动物组织切片中所含的蛋白^[9]。在病理学领域的许多应用,可以为临床诊断和治疗获得潜在的益处。MALDI-IMS 的应用可以补充组织中的药物和代谢产物的检测。

7.1 临床病理学诊断和评估 近年来, MALDI-IMS 的成像广泛应用于复杂疾病的组织研究^[10],如非小细胞肺癌、神经胶质瘤、乳腺癌和卵巢肿瘤。蛋白分子标记描绘了一个独特的数据库,对与临床信息和临床结果相关的疾病发展和治疗过程中的分子事件进行分类。通常的研究方法是比较蛋白质组分析,质谱特征(m/z 峰值)与患者数据相关。在某些研究中,实验的目的是鉴定与疾病进程相关的特殊分子。例如,神经胶质瘤或非小细胞肺癌的分子标记可用于辨别肿瘤等级并与患者的存活率相关联。鉴定异形组织特殊的细胞变化可以显著地显现如基质斑点大小和侧向分辨率等领域的展望^[9]。这些工作的完成,使得这项技术看起来和疾病的诊断以及临床结果的预测结合在一起^[10]。一个构想就是使用 MALDI-IMS 方法来评估原发不明肿瘤。

7.2 小分子成像和药物代谢 在药物发现中经常遇到的问题是如何提高药物准确到达理想区域位点,以帮助研究者更好地评估药剂和临床毒理学之间的潜在价值^[11-12]。MALDI-IMS 能够直接分析组织切片中药物分子分布。许多生物学和药理

学相关复合物的相对分子质量 1×10^3 都小于 1×10^5 ,因此称为小分子。这些分子有外源性的和内源性的,如药物化合物、滥用的药物、环境毒素、内源性代谢产物和脂类。与这一领域的标准检测方法——全身放射自显影术(WBA)相比, MALDI-IMS 有一些优点,同时也存在某些缺点。动物组织切片利用摄影胶片来检测放射性药物。与之相比, MALDI-IMS 的优点在于不需要放射标记的药物。这个巨大的优点在药物研究的早期阶段显得尤为突出,要制备放射性标记的药物是很让人厌烦的,且大量的化合物需要被屏蔽。第二个特点就是为区分药物和代谢产物提供了可能。因为全身放射自显影术(WBA)中,放射性强度可以来自放射性标记的药物和药物的代谢产物。另一方面, WBA 方法始终能产生一个结果且具有很低的检出限。在 MALDI-IMS 中,始终存在被研究的感兴趣的离子被解吸附所抑制。MALDI-IMS 的检出限很大程度上取决于药物分子,某些药物可能根本检测不到。这就是为什么 MALDI-IMS 技术在药物研究中主要用于药物的安全性研究,哪些区域是大剂量的药物应用区。近来, MALDI-IMS 变得更加实用,测量的质谱信号更具高分辨率和高精度。基质和本底离子在仪器中的干涉引起的低分辨率可以通过 MS 模型分离。这样小分子 MALDI-IMS 技术主要应用于药物化合物活性和药物代谢产物的研究。

8 结 论

MALDI-IMS 技术的出现对成像质谱领域带来了巨大的推动。MALDI-IMS 直接组织分析在评估区域分子种类和预示疾病的潜在分子标记方面是一个非常重要的技术。在实验中,分子种类的鉴定为疾病机制和病因学研究提供了一个深入探讨的工具。现在 MALDI-IMS 技术已经商业化应用,广泛地应用于记录细胞核组织中数目众多的肽和蛋白质的空间分布。还应用于研究蛋白质表达水平的变化和病理学相关的分布。此外,这项技术也常应用于跟踪药物制剂及其代谢产物在器官和整个动物体内的分布,除此之外还用于研究器官蛋白组产生的变化。现在先进的数据采集在高空间分辨率的情况下进行快速 MALDI 成像。样本的制备也在继续发展,质谱图像分析可使用多变量方法或结合其他与之相关联分析的成像信息。

参考文献

- [1] Altelaar AF, Klinkert I, Jalink K, et al. Gold-enhanced biomolecular surface imaging of cells and tissue by SIMS and MALDI mass spectrometry[J]. *Anal Chem*, 2006, 78(3): 734-742.
- [2] McDonnell LA, Heeren RM. Imaging mass spectrometry[J]. *Mass Spectrom Rev*, 2007, 26(4): 606-643.
- [3] Caldwell RL, Caprioli RM. Tissue profiling by mass spectrometry: a review of methodology and applications [J]. *Mol Cell Proteomics*. 2005, 4(4): 394-401.
- [4] Klinkert I, McDonnell LA, Luxembourg SL, et al. Tools and strategies for visualization of large image data sets in high-resolution imaging mass spectrometry[J]. *Rev Sci Instrum*, 2007, 78(5): 53-56.
- [5] Schwamborn K, Krieg RC, Reska M, et al. Identifying prostate carcinoma by MALDI-Imaging[J]. *Int J Mol Med*. 2007, 20(2): 155-159.
- [6] McDonnell LA, Heeren RM. Imaging mass spectrometry[J]. *Mass Spectrom Rev*, 2007, 26(4): 606-643.
- [7] Naoko Goto-Inouea, Takahiro Hayasakaa, et al. A new lipidomics approach by thin-layer chromatography-blot-matrix-assisted laser

desorption/ionization imaging mass spectrometry for analyzing detailed patterns of phospholipid molecular species[J]. J Chromatogr A, 2009, 1216(18):7096-7101.

[8] Groseclose MR, Andersson M, Hardesty WM, et al. Identification of proteins directly from tissue: in situ tryptic digestions coupled with imaging mass spectrometry[J]. J Mass Spectrom, 2007, 42(2):254-262.

[9] Cornett DS, Reyzer ML, Chaurand P, Caprioli RM. MALDI imaging mass spectrometry: molecular snapshots of biochemical systems[J]. Nat Methods, 2007, 4(10):828-833.

[10] 黄波, 黄文方, 卢贤瑜. 表面增强激光解析电离飞行时间质谱血

清蛋白指纹图谱在肿瘤诊断中的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2007, 28(10):944-946.

[11] Corbin BD, Seeley EH, Raab A, et al. Metal chelation and inhibition of bacterial growth in tissue abscesses[J]. Science, 2008, 319(5):962-965.

[12] Hsieh Y, Casale R, Fukuda E, et al. Matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry for direct measurement of clozapine in rat brain tissue[J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2006, 20(6):965-972.

(收稿日期:2010-05-10)

• 综 述 •

孕妇血浆中胎儿游离 DNA 用于产前诊断的研究进展

杜华荣 综述, 尹耕心, 傅克勤 审校

(安徽省计划生育科学技术研究所, 安徽合肥 230031)

关键词: 产前诊断; 胎儿; DNA; 孕妇; 血浆; 胎儿研究; 聚合酶链反应

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.04.019

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)04-0472-03

产前诊断是指在胎儿出生前利用各种方法诊断胎儿是否患有某种遗传病或先天性疾病的一种手段,是出生缺陷工作的重要任务,对于提高我国出生人口的素质有着特别重要的意义。现在的产前诊断技术大部分都属侵入性检查,有引起孕妇发生自然流产的危险,另外取材也受怀孕月份的限制。超声波检查虽然是非侵入性产前诊断的较好方法,只是诊断结果可能存在误差。开展非侵入性的准确的检测手段是广大高危孕妇的迫切需要。1997 年研究人员首次证实孕妇血浆(清)中存在游离的胎儿 DNA,并将其用于性连锁遗传病的产前诊断,为无创性产前诊断开辟了新的途径^[1-2]。现就孕妇血浆中游离 DNA 的产生的可能机制、提取及在临床的应用作简要综述。

1 孕妇血浆中游离胎儿 DNA 产生的可能机制

早在 1996 年,科学家们就已经发现从肿瘤患者的血浆中可以查出肿瘤 DNA。Lo 等^[1]认为,胎儿 DNA 对母体而言,也是外源性的,这同肿瘤患者的情况相类似。据此推测,孕妇血浆中也应该存在胎儿 DNA,并于 1997 年首次证实了这种推测,从孕 10 W 以后的孕妇血浆中检测到 Y 特异性 DNA,表明胎儿 DNA 在妊娠早期就能进入母体循环中并存在于整个妊娠过程中。母体血浆中游离胎儿 DNA 在分娩后以 2.24×10^4 拷贝快速消失,暗示游离胎儿 DNA 是大量地自由地连续在母体血液循环中释放^[3],但是目前对于孕妇血浆中胎儿 DNA 的来源尚未完全阐明,一般认为有以下 3 种可能:(1)来源于母体血液中的胎儿造血细胞。据推测,可能是胎儿细胞通过胎盘或其他胎儿-母体运送途径进入母液循环,在那里它们大部分发生凋亡转变,进而释放出游离胎儿 DNA^[4]。(2)来源于胎盘滋养层细胞。妊娠 18 天后,在绒毛膜滋养层的间叶细胞中可以检测到游离胎儿 DNA,而此时母体血液中尚未存在游离胎儿 DNA。因而有学者提出胎儿 DNA 可能是由胎盘滋养层细胞的胎儿-母体接触面被母体的免疫系统破坏后直接释放至母体血液,因为在胎盘循环发育完全时,有 80% 的孕妇血浆中能检测到胎儿 DNA。另外,在绒毛膜滋养层中的细胞在原位凋亡时,也可能释放至母体血液中。(3)来源于母婴转运。胎盘转运物质是双向的。羊水中胎儿 DNA 的浓度是孕妇血浆中的 200 倍,这种浓度梯度使得 DNA 分子可能通过胎盘和膜发生

直接转运^[5]。

2 母血浆中游离胎儿 DNA 的抽提

母血浆中含有游离胎儿 DNA 成分,但目前特异的胎儿 DNA 标记物很少,因此只有在胎儿所含的致病 DNA 与母体不同时才能检测出来;另一方面,尽管相对完整细胞而言孕妇血浆中游离胎儿 DNA 较丰富,但其仅占母体血浆 DNA 总量的 3%~6%,而无创伤性产前基因诊断在临床的广泛应用依赖于较高浓度的游离胎儿 DNA 及胎儿 DNA 的特异性标记。因此限制了游离胎儿 DNA 在临床中的应用。这两年来有些学者开始了这方面的研究。在提取胎儿 DNA 之前,对血液进行预处理,不同的血液预处理方法对孕妇血浆中游离胎儿 DNA 的百分含量有明显的影响。有学者用甲醛预处理孕妇外周血,通过减少母体血细胞的溶解来减少游离母体 DNA,从而提高孕妇外周血中游离胎儿 DNA 的百分含量,然而也有学者认为经甲醛处理的血浆无论用任何方法,都不能得到 RNA 的扩增,即甲醛处理的血浆不能用于对 RNA 的研究^[6]。有学者将孕妇外周血经 EDTA 抗凝之后,以离心半径 8 cm, 3 000 r/min 离心 10 min,取上清液重复离心 1 次,然后按照血样 DNA 提取试剂盒(QIA amp DNA blood mini, Qiagen)说明书中血液或体液 DNA 的提取方案提取 DNA,这种方法是目前最为常用的提取方法^[7]。除此之外,目前用于提取胎儿 DNA 的方法还有煮沸法和改良的酚/氯仿法等。提取后的 DNA 可以用于巢式 PCR 技术,实时荧光定量 PCR 技术,变性高效液相色谱技术等方法进行相关检测。

3 母血中胎儿 DNA 在产前诊断中的临床应用

3.1 在新生儿溶血性疾病中的应用 新生儿溶血病是指母婴血型不合,母血中对胎儿红细胞的免疫抗体 IgG 通过胎盘进入胎儿循环,发生同种免疫反应导致新生儿红细胞破坏而引起的溶血。新生儿溶血病以 ABO 血型系统不合最为多见,其次是 Rh 血型系统不合。其中以后者的危害更大一点。Rh 血型系统不合是由于来自胎儿 RhD 阳性红细胞进入了 RhD 阴性母体的血循环,导致其产生免疫抗体,该抗体能通过胎盘进入胎儿血循环,引起胎儿发病,症状从轻度贫血到严重溶血性反应,甚至宫内死亡。RhD 阴性的孕妇,若其血浆或血清中存在胎