

modeling after myocardial infarction[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2010, 299(6): H1795-1804.

[19] Marfella R, Siniscalchi M, Esposito K, et al. Effects of stress hyperglycemia on acute myocardial infarction: role of inflammatory immune process in functional cardiac outcome[J]. Diabetes Care, 2003, 26(11): 3129-3135.

[20] Dandona P, Aljada A, Bandyopadhyay A. The potential therapeutic role of insulin in acute myocardial infarction in patients admitted to intensive care and in those with unspecified hyperglycemia [J]. Diabetes Care, 2003, 26(2): 516-519.

[21] Beckman JA, Creager MA, Libby P. Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management [J]. JAMA, 2002, 287(19): 2570-2581.

[22] Deedwania P, Kosiborod M, Barrett E, et al. Hyperglycemia and acute coronary syndrome: a scientific statement from the American

Heart Association Diabetes Committee of the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism[J]. Circulation, 2008, 117(12): 1610-1619.

[23] 王帅. 胰岛素抵抗对急性 ST 段抬高型心肌梗死患者早期 PCI 治疗后心肌灌注及预后的影响[J]. 中国现代药物应用, 2013, 7(8): 112-113.

[24] Li J, Zhang H, Wu F, et al. Insulin inhibits tumor necrosis factor-alpha induction in myocardial ischemia/reperfusion: role of Akt and endothelial nitric oxide synthase phosphorylation [J]. Crit Care Med, 2008, 36(5): 1551-1558.

[25] 韦广洪. 胰岛素对心肌梗死后心脏炎症反应的影响及其心脏保护作用研究[D]. 西安:第四军医大学, 2013.

(收稿日期:2013-12-25)

• 综述 •

电泳技术在蛋白质分析中的应用进展

王雪梅¹, 张 轩² 综述; 陈 鸣^{1△} 审校

(1. 第三军医大学大坪医院野战外科研究所检验科, 重庆 400042;
2. 重庆医科大学儿科学院 2010 级, 重庆 400331)

关键词: 电泳, 毛细管; 质谱分析法; 光谱法, 质量, 电喷雾电离; 蛋白质阵列分析

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.10.035

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)10-1314-03

随着人类基因组计划的逐步完成, 人类进入了后基因组时代, 蛋白质组则是其中的重要方面, 寻求一种快速、高效的蛋白检测技术已成为时代的需求。毛细管电泳-质谱(capillary electrophoresis-mass spectrometry, CE-MS)技术综合了 CE 的高灵敏度、高分离效率所需的样品量少、成本低以及 MS 的定量、高选择性等多方面优势, 在蛋白质检测方面有很强的优势。芯片电泳及阵列化技术不仅使检测更方便、快捷, 而且实现了高通量检测。现已成为进行蛋白质组学分析的常用技术手段。本文就电泳技术在蛋白质分析中的应用进展作一综述。

1 CE 的特点

CE 由于其自身具有的高分辨率、高灵敏度、重复性好、进行定量分析和自动化程度高等诸多优点^[1], 在其出现后的几年时间里就已成为蛋白质、核酸及其他生物分子分离和分析的一项重要技术, MS 技术由于其在物质检测方面的高特异性及较高的分辨能力而得到广泛的应用, CE-MS 技术一经推出即引起了大家的重视, 并在生命科学研究中得到广泛应用。现在已成为蛋白质组学研究中的首选技术^[2]。

CE-MS 技术集合了 2 种检测方法的优势, 扩大了 CE-MS 所能分析样品的范围。通过与不同 MS 联用可以获得不同的分离能力及分离效果, 适用于不同样品的分离情况^[2-3]。

CE-MS 技术分在线联用和离线联用 2 种方式。CE 与 MS 离线联用的关键是对已分离样品的有效收集, 并不涉及真正意义上的联用接口技术; 与离线联用相比, 二者在线联用具有样品损失少、自动化程度高、分析速度快等优点, 其应用比离线联用广泛得多。CE 与 MS 在线联用需要设计合适的接口, 能够

将已分离的样品全部转移到 MS 仪中, 同时实现样品快速、高效地离子化。二者联用中的接口技术是影响检测效果的关键。电喷雾离子化(electrospray ionization, ESI)和基质辅助激光解吸电离(matrix-assisted laser desorption ionization, MALDI)是目前应用比较广泛的 CE-MS 技术^[3]。ESI、MALDI 与 CE 的联用大大增加了 CE 技术在蛋白质以及多肽分析领域中的应用^[4-8]。MALDI 与 MS 联合在杂质的处理方面具有明显优势, 但是由于在 MS 检测前一般会进行样品的纯化加工, 且 MALDI-MS 的连续直接进样模式会引起检测峰变宽, 影响检测结果^[9-10]。

ESI-MS 是比较常用的方式, 因为此方法可以将液相的蛋白直接转化成气象离子。可进行生物大分子的分离和检测。其最重要的问题就是阻止 CE 对 MS 中电离的影响。CE 和 ESI 电流回路的分离在物质分离和检测过程中是必须要考虑的, 因为这可能会影响电喷雾的离子化效率。特别是运用 ESI 的正性检测负性蛋白的过程中, 为了提高分离效率, 提高电压也是非常必要的, 因提升电压引起的发热现象对物质的分离结果基本无影响^[6]。

目前 CE-ESI-MS 接口主要分为鞘液接口和无鞘液接口 2 种。(1) 鞘液接口技术。在多数产品中用于分离的毛细管被另一个直径更大的同轴管包裹, 支持鞘液最终在毛细管介导下通过外管, 既不通过外加泵, 也不通过水动力学, 而是在圆锥体内直接与毛细管的缓冲液进行混合, 关闭电流循环。由于此技术提供了更灵活的检测方式, 已被广泛应用于蛋白质分析^[11]。毛细管柱通过一个非常细的金属管插入 ESI 的电离区, 可以将

鞘液转移到毛细管柱的出口处。由于鞘液与毛细管柱中的样品液混合,可以形成非常稳定的电喷射流^[6]。与非鞘液连接方式相比,由于鞘液的引入,对样品进行了稀释,因而降低了检测的灵敏度。为获取稳定分析物的分离,不仅要考虑静电力参数,其他有关 ESI 自身的参数也需纳入考虑,并达到最优状态,如鞘液组成、流速、毛细管端口的位置、干燥气的温度、电离气体的流速和压力等,最终才可获得一个很高的检测信号^[12]。获得电喷雾的稳定需要复杂的参数平衡,如毛细管位置、鞘液的流速和 ESI 条件^[11]。鞘流液技术的应用可以有效加强电喷雾形成过程的稳定性。可以减少非挥发组分的影响,提高检测的选择性^[13]。由于此连接方式的高稳定性,其优势可有效克服低灵敏度造成的影响。低流速可以降低鞘液的稀释作用,同时,铂丝构成电流回路可避免因流速低所造成的断流,且通过流速的调节可有效提高电离效率和检测效果^[14]。(2) 非鞘液接口技术。非鞘液接口技术由于不存在任何稀释效应而逐渐受到研究者的青睐。此技术不能像鞘液接口技术那样依靠稳定的喷雾实现电流回路,因此,必须采用一些其他的方法来形成电流回路。将 CE 中毛细管的末端做成锥形,并在其上涂渍一层导电材料,如金、聚合物或传导金属丝等,利用导电材料形成电流回路。但此方法耗时长,装置的坚固性和稳定性有待进一步提高。由于导电材料的自身特点导致电喷雾流不稳定,实验的重复性较差,但是,与鞘液连接技术相比,该法在混杂物质的分离中具有明显优势,而且具有很好的可操作性和较高的灵敏度^[1,15]。液接型接口是接口技术中比较特别的一种。与其他非鞘液接口相比,液接型接口可以通过液接液体来改变 CE 运行缓冲液的组成,使其满足电喷雾离子源的要求。与鞘液接口相比,液接型接口不存在鞘液的稀释作用。然而,液接型接口最大的问题在于液接处有一定的死体积,会影响分离的效果。通过在液接型接口上加压可在一定程度上解决这个问题。

CE-MS 既可以对经过蛋白酶水解后形成的蛋白片段进行检测,通过对蛋白肽谱图进行分析,确定蛋白质的种类,也可对完整的蛋白进行检测,同时还可对蛋白转录后的修饰以及不同生物分子的构型进行分析,为分子鉴定提供依据^[3]。目前,此技术已在临床蛋白质组研究中得到了广泛应用。运用此技术对各种体液实施检测,可有效地对相关疾病进行诊断^[3]。如通过对尿液中各种蛋白质及肽的分析,确定是否患有肾病或肿瘤^[3]。但是,二者之间的连接方式仍然是一个问题,目前对蛋白质组进行分析的平台建立尚不完善。

2 芯片 CE

芯片 CE 是近几年才发展起来的分离、分析新技术,具有微型化、快速、高效等优势^[16]。所需样品量较常规 CE 更少,且应用范围广,可用于氨基酸、多肽、蛋白质、DNA 及寡核苷酸的分离、分析等。在生物技术和生命科学领域中获得了广泛应用^[17]。

芯片 CE 技术是在芯片上进行常规 CE 操作,利用玻璃、石英或各种聚合物材料加工微米级通道,以高压直流电场为驱动力,对样品进行进样、分离及检测^[4]。它与常规 CE 的分离原理相同。与常规 CE 系统相比,芯片 CE 系统还具备分离时间短、分离效率高、系统体积小、易于操作等优点。芯片 CE 的上述优点使其在近几年得到了快速发展,成为蛋白质分离、分析的重要手段^[18]。芯片 CE 的一般构造包括 2 条互相垂直的管

道和 4 个存储池。短管道用于样本的加入,长管道用于分离^[19]。当样品加入到样品池后,短管道两侧的电压导致样品发生移动,样品从样品池流向废料池。当电压发生改变,样本便进入分离阶段^[18]。

芯片 CE 分离蛋白质主要采用区带电泳、凝胶电泳、等电聚焦、胶束电动色谱及二维电泳等模式^[4]。在芯片 CE 分离蛋白质的研究中所要解决的一个重要问题就是通道表面对大分子蛋白质的吸附问题。蛋白质与芯片通道内壁之间的微小吸附效应就会降低蛋白质的分离效率,引起峰形变宽拖尾,影响分离的重现性。在毛细管区带电泳分离模式下,一般采用通道内壁永久改性和缓冲液中加入添加剂进行动态修饰两种方法来抑制蛋白质的吸附。芯片 CE 除存在上述问题外,其检测手段的单一性也限制了它的广泛应用^[20]。目前芯片 CE 普遍采用的是紫外或荧光检测,与 MS 的联用尚存在很大的问题,所以其检测的灵敏度及分析效果与常规 CE 之间还存在一定的差距。

3 展望

目前 CE 技术已得到广泛应用,尤其在蛋白质的分离鉴定方面,其对于研究蛋白质结构的表征,包括纯度、浓度、等电点、相对分子质量、肽谱、氨基酸序列、N-端氨基酸序列的测定以及蛋白质间相互作用方面具有独到优势^[21]。但是,随着蛋白质组学的提出,对 CE 技术的检测和分离效果以及大规模、高通量检测提出了更高的要求。其自身的理论和技术尚需不断完善^[1-2]。

CE 技术目前的发展趋势包括 CE-MS、芯片 CE 以及实现阵列化。虽然对于上述 3 个方面,科学家们已经做了大量的工作,并且取得了一定的成绩,但其中涉及的共同问题尚需解决,如寻求合适的样品预富集技术、毛细管中固定分离相的改进以及分离后样品的联合检测技术等。相信随着 CE 技术的不断发展和改进,其在基础研究以及临床实践方面都将得到更广泛地应用。

参考文献

- [1] 张秀敏,张曼.毛细管电泳分离技术的进展及其在蛋白质分离中的应用[J].标记免疫分析与临床,2009,16(5):326-328.
- [2] El Rassi Z. Electrophoretic and electrochromatographic separation of proteins in capillaries: an update covering 2007-2009[J]. Electrophoresis, 2010, 31(1):174-191.
- [3] Desiderio C, Rossetti DV, Iavarone F, et al. Capillary electrophoresis-mass spectrometry: recent trends in clinical proteomics[J]. J Pharm Biomed Anal, 2010, 53(5):1161-1169.
- [4] Kolch W, Neusüss C, Pelzing M, et al. Capillary electrophoresis-mass spectrometry as a powerful tool in clinical diagnosis and biomarker discovery[J]. Mass Spectrom Rev, 2005, 24(6):959-977.
- [5] Mischak H, Coon JJ, Novak J, et al. Capillary electrophoresis-mass spectrometry as a powerful tool in biomarker discovery and clinical diagnosis: an update of recent developments[J]. Mass Spectrom Rev, 2009, 28(5):703-724.
- [6] Ahmed FE. The role of capillary electrophoresis-mass spectrometry to proteome analysis and biomarker discovery[J]. J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci, 2009, 877 (22): 1963-1981.

(下转第 1323 页)

允许范围内。在精密度和正确度均通过的条件下对健康人群标本进行检测。

1.6 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件对不同方法检测结果、农村与城市人群检测结果及各年龄段人群检测结果进行统计学分析。按 CLSI C28-P3 文件建议的 Dixon 法判断离群值,剔除离群值。按 CLSI C28-P3 文件推荐的非参数法计算 95% 参考区间的上、下限^[1],计算参考区间。按 CLSI C28-P3 文件推荐的 Harris and Boyd 法,即比较 Z 值和 Z^* 值来判断是否需要按性别对参考区间进行分组,若 $Z > Z^*$,则需要分组,以 $\alpha=0.05$ 为检验水准,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 2 种方法检测铁、镁的结果 2 种方法检测铁、镁测定结果的差异无统计学意义(P 分别为 0.207、0.630),将 2 种方法的铁、镁检测结果合并为一组。

2.2 农村与城市人群铁、镁检测结果 农村与城市人群铁、镁测定结果的差异无统计学意义(P 分别为 0.413、0.516),将农村与城市人群铁、镁测定结果合并为一组。

2.3 各年龄段人群铁、镁检测结果 $18 \sim <30$ 岁、 $30 \sim <40$ 岁、 $40 \sim <50$ 岁、 $50 \sim <60$ 岁、 $60 \sim <80$ 岁人群铁检测结果的差异无统计学意义($P > 0.05$),将各年龄段人群铁检测结果合为一组。 $18 \sim <30$ 岁、 $30 \sim <40$ 岁、 $40 \sim <50$ 岁、 $50 \sim <60$ 岁、 $60 \sim <80$ 岁人群镁检测结果的差异无统计学意义($P > 0.05$),将各年龄段人群镁检测结果合为一组。

2.4 男、女性受检者铁、镁的检测结果 男、女性受检者铁 95% 参考区间分别为: $10.05 \sim 36.21$ mmol/L、 $6.19 \sim 30.87$ mmol/L; 男、女性受检者镁 95% 参考区间分别为: $0.76 \sim 1.06$ mmol/L、 $0.74 \sim 1.04$ mmol/L。铁检测的 Z 、 Z^* 值分别为 7.22、4.80, $Z > Z^*$, 需要分组; 镁检测的 Z 、 Z^* 值分别为 1.90、3.54, $Z < Z^*$, 不分组。

3 讨 论

微量元素可以作为酶、激素等的辅助因子,参与机体的各种代谢,并与冠心病、高血压、不孕症的发病等有关^[2-3]。目前微量元素的研究多集中在孕妇和儿童,正常健康人群的研究较少^[4]。本研究对检验前的质量进行了有效控制,分析前质量保证在参考区间研究和检验质量控制中有重要意义。健康参考

(上接第 1315 页)

- [7] Klampfl CW. Recent advances in the application of capillary electrophoresis with mass spectrometric detection[J]. Electrophoresis, 2006, 27(1): 3-34.
- [8] Klampfl CW. CE with MS detection: a rapidly developing hyphenated technique[J]. Electrophoresis, 2009, 30(Suppl 1): S83-91.
- [9] 徐静,万家余,许娜,等. MALDI 质谱成像的样本制备技术及应用研究进展[J]. 中国实验诊断学, 2012, 16(10): 1939-1942.
- [10] 洪剑锋. 质谱技术在卵巢癌血清多肽分析过程中的应用[J]. 科技信息, 2012(19): 52-53.
- [11] 曹卫荣,张世光,王晓婧,等. 毛细管电泳技术在蛋白质生物制品分析中的应用研究进展[J]. 化学与生物工程, 2012(6): 20-23.
- [12] 陈泓序,张新祥. 免疫亲和毛细管电泳的研究进展[J]. 色谱, 2009, 27(5): 631-641.
- [13] 胡月芳,李建平,刘蓉,等. 毛细管电泳-电致化学发光联用技术应用进展[J]. 理化检验: 化学分册, 2011(5): 618-623.
- [14] 邓樱花,王红,张华山. 高效液相色谱和毛细管电泳分离荧光检测小分子氨基生物物质的进展[J]. 分析科学学报, 2010, 26(1):

人群的筛选是本次研究的关键内容之一,为了保证研究的科学性和可靠性,本研究结合调查问卷和实验室检查,在调查问卷阶段将对人群进行身高、体质量、血压、脉搏及尿常规初筛。本研究所有样本都在样本采集后 2 h 内离心,并在离心后 4 h 内完成分析。建立参考区间的一个重要前提是检测结果准确可靠。本研究在检测评估阶段完成并合格后才进行健康人群参考区间的检测,并应用卫生部临床检验中心下发的正确度评定样本,保证了检测结果的可靠性。结果显示,2 种方法、城市与农村人群、各年龄段人群铁、镁检测结果的差异均无统计学意义,可将结果合为一组。男、女性铁检测结果有差异,需按性别进行分组,即,男性: $10.05 \sim 36.21$ mmol/L, 女: $6.19 \sim 30.87$ mmol/L; 男、女性镁检测结果的差异也无统计学意义,可将其合为一组,参考区间为 $0.74 \sim 1.06$ mmol/L。本研究统计了西北地区健康人群铁、镁的检测结果,包括市民、农民、学生及军人等;采用了 2 种不同的检测系统。由于微量元素的结果不仅与性别、年龄等生理因素有关,还具有地理、地域分布特性^[4-5],本研究结果显示,西北地区健康人群铁、镁结果有所提高,并且高于目前临床所用的参考区间;与国内检测结果(全国 6 家实验室参与了中国人群参考区间的建立)也有所差异,其 95% 参考区间窄于国内检测结果的 95% 参考区间。

参 考 文 献

- [1] 曾洁,陈文祥,申子瑜. 参考区间研究现状概述[J]. 中华检验医学杂志, 2010, 33(6): 570-573.
- [2] 宋俐. 微量元素与预防保健[J]. 临床合理用药杂志, 2009, 2(5): 67-67.
- [3] 郭宏昌,高琦,褚小宗. 微量元素与不孕症[J]. 河南预防医学杂志, 2001, 12(5): 310-311.
- [4] 廖燕霞. 广州市芳村区 253 例正常儿童全血微量元素水平分析[J]. 广东微量元素科学, 2005, 12(8): 26-28.
- [5] 苗健,高琦,许思来. 微量元素与相关疾病[M]. 石家庄: 河南医科大学出版社, 1997.

(收稿日期: 2014-02-28)

103-108.

- [15] 周志贵,李珉,白玉,等. 毛细管电泳-质谱联用技术的新进展[J]. 色谱, 2009, 27(5): 598-608.
- [16] 陈执中. 新的芯片毛细管电泳及其联用技术研究应用进展[J]. 药物生物技术, 2007, 14(1): 71-75.
- [17] 董娅妮,方群. 微流控芯片毛细管电泳在蛋白质分离分析中的应用研究进展[J]. 色谱, 2008, 26(3): 269-273.
- [18] Tran NT, Ayed I, Pallandre A, et al. Recent innovations in protein separation on microchips by electrophoretic methods: an update [J]. Electrophoresis, 2010, 31(1): 147-173.
- [19] 刘春叶,许旭,张剑. 毛细管电泳 DNA 分离的理论进展[J]. 化工时刊, 2009, 23(2): 62-72.
- [20] 李想,童艳丽,刘翠,等. 毛细管电泳与芯片毛细管电泳的双检测技术[J]. 分析化学, 2009, 37(10): 1547-1554.
- [21] Jiang C, Armstrong DW. Use of CE for the determination of binding constants[J]. Electrophoresis, 2010, 31(1): 17-27.

(收稿日期: 2014-01-14)