

## 复杂生物体系中蛋白质高效分离分析技术的新进展

孟庆芳, 张养军, 王京兰, 蔡 耘, 钱小红

(军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850)

**摘要** 继人类基因组计划完成之后,作为一种新的研究策略,蛋白质组学在生命科学研究中发挥着愈来愈重要的作用。由于生物体系的复杂性和多样性,使得分离效率高、灵敏度高、通量高和动态范围宽的分离分析技术平台的研究和应用已成为蛋白质组学研究的重点和热点之一。着重介绍了近年来应用日益广泛的多维色谱预分离、毛细管液相色谱-质谱联用、毛细管电泳及其与质谱联用等高效分离分析技术在复杂生物体系的蛋白质分析中的最新进展。引用相关文献 40 篇。

**关键词** 蛋白质组学;多维色谱;毛细管液相色谱-质谱;毛细管电泳-质谱;复杂生物体系

**中图分类号** :O658      **文献标识码** :A      **文章编号** :1000-8713(2005)01-0026-06

## New Advances of High Performance Separation and Analytical Techniques for Proteins in Complex Biological Systems

MENG Qingfang, ZHANG Yangjun, WANG Jinglan, CAI Yun, QIAN Xiaohong

(Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medicine Sciences, Beijing 100850, China)

**Abstract** : As a new strategy, proteomics is playing more and more important roles in the life sciences after the sequencing of the human genome was completed. Because a biological system is very complex and diverse, the study and application of technological platform for the separation and analysis with high resolution, high sensitivity, high throughput and broad dynamic range have become one of the important and hot spots. The review focused on the new progress of high performance separation and analysis techniques which were applied to the field of proteomics increasingly, such as multidimensional liquid chromatography for pre-fractionation, capillary liquid chromatography coupled with mass spectrometry and capillary electrophoresis interfaced on line with mass spectrometry.

**Key words** : proteomics; multidimensional chromatography; capillary liquid chromatography coupled with mass spectrometry; capillary electrophoresis interfaced with mass spectrometry; complex biological system

在人类基因组计划完成之后,科学家们发现人类遗传密码的破译并没有像之前预测的那样能够揭开人类自身的终极奥秘,而仅仅是揭开了研究的序幕。现在获得的基因组知识还不能告诉我们从人的 30 亿个碱基对序列中获得的基因组是如何决定一个人的个体特征以及它们编码的蛋白质到底在人体内起什么样的作用和如何起作用<sup>[1]</sup>,这些问题只有依赖于功能基因组学的深入研究才能给出最终的答案。作为功能基因组学主要支柱的蛋白质组学是了解基因功能的重要途径之一。我们知道,蛋白质组是一个细胞、组织、器官或个体拥有的全套基因所对

应的全部蛋白质。在生物体内,蛋白质的表达由于具有时间和空间的特殊性,与它的模板——作为遗传物质的稳定的基因之间既有密切联系又有很大区别,所以蛋白质组与基因组相比复杂程度显著增大,主要表现在(1)基本结构单元不同,脱氧核糖核酸(DNA)的数目只有 4 种,而氨基酸的种类却有 20 余种之多;(2)人类基因组的数目已经知道的约 3 万种<sup>[1]</sup>,但是,由于信使核糖核酸(mRNA)的自身剪切、拼接、翻译修饰和翻译后修饰的大量存在,使其翻译产物蛋白质的数量可能是基因数量的数十倍,甚至百倍以上<sup>[2]</sup>;(3)基因组在每一个细胞中的

收稿日期 2004-09-20

作者简介 孟庆芳,女,硕士研究生。

通讯联系人 钱小红,女,研究员,博士生导师,Tel/Fax (010)68279585,E-mail qianxh@nic.bmi.ac.cn.

基金项目 国家自然科学基金(项目号 20275046,20405017)、国家科技攻关计划项目(项目号 2202-BA711A11)及北京市科技计划项目(课题编号:H030230280190)资助。

表达大体相同,而蛋白质在不同的细胞、组织、器官、体液中以及不同时间段的表达却是千差万别,不仅种类繁多,而且动态范围宽,仅一个人体细胞在不同时段、不同水平表达的蛋白质就有 15 000 种之多,且浓度有 5 个数量级的差别<sup>[3]</sup>,而目前由于蛋白质组学尚缺乏像基因组学聚合酶链反应(PCR)那样的蛋白质的体外扩增技术,因此低丰度蛋白质的检测仍是一个难题(4)DNA 是单独存在的,而蛋白质(尤其是与生理或病理反应直接相关的信号转导因子)通常是经过磷酸化、糖基化等方式修饰的,这些修饰普遍大量存在并且是动态的,与其对外界刺激的应答有关。面对如此复杂的体系,蛋白质组学的研究需要分离效率高、灵敏度高、通量高、动态范围宽的分析技术平台来支持。目前,蛋白质组学研究中常用的分离技术——双向凝胶电泳虽然具有分辨率高和直观的优点,但该方法本身存在一些严重缺陷:对等电点极酸( $pI < 3$ )、极碱( $pI > 12$ )的蛋白质和相对分子质量较大( $> 100$  kb)或较小( $< 10$  kb)的蛋白质的分离无能为力<sup>[4]</sup>;蛋白质回收率低、损失严重,操作步骤繁杂、自动化程度不高。因此分离分析技术的缺乏仍是蛋白质组学研究的瓶颈之一。近年来,为探索建立更为出色的蛋白质的分离和鉴定技术平台,高效液相色谱(HPLC)、毛细管电泳(CE)等高效分离技术逐渐引起研究人员的重视,被越来越多地引入到蛋白质组学的研究之中,在生命科学领域发挥着越来越重要的作用。本文结合蛋白质组学的研究策略,着重介绍多维色谱、毛细管液相色谱-质谱联用、毛细管电泳及其与质谱联用等关键技术,在复杂生物体系的蛋白质研究中的最新进展。

## 1 基于液相色谱的分离技术

### 1.1 整体蛋白质混合物的多维色谱分离技术(multidimensional liquid chromatography)

根据 Giddings 的理论,多维色谱的总峰容量( $P$ )等于每一维的峰容量( $P_i$ )的乘积<sup>[3]</sup>,即: $P = P_1 \times P_2 \times P_3 \dots$ 。因此从理论上可知,多维色谱分离系统比一维色谱可提供更高的峰容量,更适用于分离复杂生物体系。多维色谱分离系统的基本原理是按照样品中各个组分性质上的差异,如:根据等电点、相对分子质量、分子大小、带电状况、疏水性等的差异,首先进行第一维分离,然后将第一维馏分再进行第二维分离。为了得到最大的分离效率,必须注意以下两点(1)理想情况下,各维应具有完全不同的分离机制(2)高维的分离速度应快于低维的分离速度,以避免已分开的组分在高维分离中重新混合<sup>[5]</sup>。常采用的二维分离模式有:离子交换色谱-反

相液相色谱、色谱聚焦-反相液相色谱、分子排阻色谱-反相液相色谱、亲和色谱-反相液相色谱等。其中,反相液相色谱因其高效的分离能力、无盐以及便于后续处理而常被作为二维分离体系中的最后一维。

多维色谱预分离是大规模蛋白质鉴定的基础,由于其分离效果直接影响下游的质谱鉴定,所以世界各国的研究小组都投入了巨大的资金和人力,期望最大限度地减小复杂生物样品的复杂程度,鉴定出较低丰度的蛋白质。Lubman 研究小组<sup>[6]</sup>在研究白血病细胞系蛋白质组时,对整体蛋白质首先进行二维液相色谱分离,其中第一维(称为色谱聚焦)根据不同蛋白质的等电点不同进行分离,第二维以非多孔填料的反相柱进行分离,将收集到的馏分进行浓缩和酶解后用基质辅助激光解吸电离/飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)进行蛋白质鉴定,共鉴定出相对分子质量为 12 000 ~ 75 000 的蛋白质 37 个,与二维凝胶电泳相比,对低质量范围蛋白质的鉴定率有所提高,并实现了仪器的自动化,提高了分析通量。Zhu 等<sup>[7]</sup>以多维液相色谱分离人乳腺癌细胞系的蛋白质,将收集的馏分酶解后用 MALDI-TOF-MS 和毛细管电泳-电喷雾离子化源-飞行时间质谱(CE-ESI-TOF-MS)鉴定,将这两种方法得到的信息综合起来,对较小蛋白质肽段的匹配率可达到 100%,对相对分子质量为 75 000 的较大蛋白质的匹配率亦可达到 90%,表明采用多维色谱对整体蛋白质预分离,酶切后用 ESI-TOF-MS 鉴定,可获得多肽的精确的相对分子质量,通过蛋白质数据库检索,可对蛋白质进行可靠的鉴定。

另外,色谱分离还可与其他分离手段相结合,用于蛋白质翻译后修饰的研究中。例如,对一种天然的存在于细胞膜表面的蛋白质 Reggie-1 的研究。此种蛋白质有数个磷酸化位点,但具体位点不清楚。由于这种膜蛋白质不仅丰度低,而且疏水性强,用一般的电泳或亲和色谱分离不能满足要求,所以 Bauer 等人<sup>[8]</sup>提出了一种二维液相色谱(2D-LC)与十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)相结合的技术路线,蛋白质既可用 SDS-PAGE 和蛋白印迹法(Western Blotting)识别,也可结合质谱识别。他们采用基质辅助激光解吸电离-傅里叶变换离子回旋共振质谱(MALDI-FTICR-MS)来研究蛋白质 Reggie-1 的结构,获得了满意的质谱图,从而证明此方法可以用于分析蛋白质的修饰种类和位点。Lubman 等人<sup>[9]</sup>还以色谱聚焦与非多孔填料的反相液相色谱对蛋白质混合物进行了二维液相色谱分离,第二维的馏分直接进入 ESI-TOF-MS 中测定

蛋白质的精确的相对分子质量,并结合蛋白质鉴定结果,分析蛋白质翻译后的修饰情况,提供了一条研究蛋白质修饰的新思路。

## 1.2 多肽混合物的分离技术

液相色谱与质谱在线联用技术的关键是解决二者之间的接口问题。目前常用的液相色谱-质谱联用均以大气压电离源(API)作为接口,主要包括:电喷雾离子化(electrospray ionization,ESI)、气动辅助电喷雾即离子喷雾离子化(ion spray ionization,ISI)和大气压化学离子化(atmospheric pressure chemical ionization,APCI)3种模式。它们的共同点是样品的离子化处于大气压下;特点是离子化效率高。与其他类型接口相比,适用于中等极性到强极性的化合物分子,尤其是预先能在溶液中形成离子的化合物和可获得多个质子的大分子(蛋白质)<sup>[10]</sup>。其中电喷雾接口具有一些更加适合于蛋白质分析的特点(1)蛋白质离子化效率可达100%;(2)可提供多种离子化模式;(3)可产生稳定的多电荷离子,尤其适用于蛋白质等生物大分子;(4)离子化方式较软,与飞行时间(TOF)、四极杆(Q)、离子阱(IT)等质量分析器或多级质量分析器组合在一起,应用最为广泛。

目前非胶体系的大规模蛋白质鉴定应用的主要技术是由Yates研究组<sup>[11]</sup>提出的“鸟枪法”(shotgun),其基本技术路线是首先对提取的蛋白质溶液进行酶切,然后对肽混合物进行多维毛细管液相色谱分离和串联质谱分析以及数据库检索,从而确定蛋白质的种类。他们把这种思路称为多维蛋白质鉴定技术,即MudPIT(multidimensional protein identification technology)。具体做法是将一根色谱柱的前半部分装填强阳离子交换树脂(SCX),后半部分装填反相(RP)色谱填料,与ESI源的串联质谱直接联用。进样时,低于流动相起始液pH的多肽首先保留在SCX色谱柱上,然后采用一系列阶梯浓度梯度的盐溶液进行洗脱,使每个脉冲洗脱的组分在不同时间段到达RP色谱柱上,再在RP色谱柱上进一步分离,并用质谱在线检测,从而完成一个样品的全分析。随后他们对该方法进行了改进,即在两相色谱柱SCX填料的前端再增加一种用于脱盐的RP填料,制成RP-SCX-RP三相柱,并将此策略用在分析牛脑微管相关蛋白质的研究中。通过将这种三相填料柱的性能与两相或单相柱比较,显示三相柱鉴定出的蛋白质种类最多,且发现了一部分两相柱未能发现的疏水蛋白质<sup>[12]</sup>。

研究人员在寻找新的药物靶标、研究差异蛋白质组时也常常应用LC-MS/MS技术。Soreghan

等<sup>[13]</sup>将液相色谱与串联质谱联用,用于研究大鼠脑内与衰老有关的蛋白质,一个流程即鉴定出100个羧基化蛋白质,加上以往采用双向电泳技术鉴定出的蛋白质,他们鉴定出的蛋白质已经涉及到低丰度的、参与糖和能量代谢的受体蛋白质、线粒体蛋白质,以及一系列与细胞信号转导途径相关的受体蛋白质,这些研究结果将大大加速药靶的发现以及针对性药物的研究与开发。Leiweber等<sup>[14]</sup>还建立了毛细管填充柱以及毛细管整体柱LC与ESI-FTICR-MS在线快速鉴定多肽混合物的方法。与普通填充柱对比,在分析复杂混合物时,发现整体柱可大大节省分析时间,提高分离效率,对1000种以上的肽混合物用整体柱毛细管液相色谱-电喷雾离子化源-傅里叶变换离子回旋共振质谱(cap-LC-ESI-FTICR-MS)分析仅需20min。Vollmer等<sup>[15]</sup>也将此技术应用用于研究大肠杆菌在不同的碳源(葡萄糖和乳糖)情况下蛋白质表达的异同的研究中。另外,LC-MS/MS还可用于研究蛋白质动态范围方面。Wu等<sup>[16]</sup>以血浆中的生长激素为例,采用LC-MS/MS路线详细研究了ESI-MS的动态范围。生长激素是血浆中典型的低丰度(fmol以下水平)蛋白质,检测难度很大。研究结果发现此路线不仅检测出了生长激素,而且检测动态范围可以达到4000。他们还运用shotgun技术分析血浆(血浆中蛋白质动态范围宽),并且采用了离子阱质谱和目前灵敏度、准确度最高的FTICR-MS两种质谱检测手段,显示出比双向电泳更强大的分析能力,也进一步证明了shotgun技术可作为分析复杂样品时多维分析的手段<sup>[17]</sup>。而最近Cargile等<sup>[18]</sup>采用LC-MS/MS技术路线,利用一种具有计算功能的质谱仪对结果进行分析,根据泊松分布规律得到单个细胞中蛋白质的动态范围。

目前,纳升级毛细管液相色谱在LC-MS联用中越来越受到研究人员的重视。纳升级流速的获得是利用一分流器将流动相在进入毛细管色谱柱前按比例进行分流,使真正进入毛细管色谱柱的流动相的流速降至nL/min级,这样不仅可以显著降低进样量,还可以通过延长质谱的数据采集时间来提高检测灵敏度,特别适用于样品量较少的多肽混合物的分离和鉴定。

最近,Shen等<sup>[19,20]</sup>提出一种可获得超高灵敏度、极宽动态范围的蛋白质鉴定技术路线。他们将*D. radiodurans*菌全溶液酶切、固相萃取柱脱盐后,经固相微萃取、纳升级HPLC(色谱柱为内径15 $\mu$ m、长85cm的C<sub>18</sub>柱)分离,采用电喷雾接口与FTICR-MS在线联机分析,从2.5ng样品中鉴定出

蛋白质 872 个,动态范围达到  $10^5 \sim 10^6$ ,单个蛋白质的检测灵敏度达到前所未有的程度( $< 75 \text{ zmol}$ ),峰容量接近 1 000,整套路线的分析速度达到 3 h 分析 1 个样品,1 h 鉴定 50 个蛋白质。他们又将纳升级强阳离子交换色谱、反相液相色谱的二维分离与串联质谱鉴定结合起来研究人血浆蛋白质组,得到的总峰容量大于 10 000,运用 SEQUEST 软件检索从 365 mg 血浆中鉴定出 800 ~ 1 682 个蛋白质,是目前鉴定血浆蛋白质最多的技术方法<sup>[21]</sup>。

## 2 毛细管电泳及其与质谱联用分析技术

### 2.1 毛细管电泳

毛细管电泳是一种经典电泳技术与现代微柱分离有机结合的分离技术,与经典电泳相比,CE 由于其侧面积/截面积大,散热快,能克服由于焦耳热引起的谱带展宽,且可承受高电压,因此分离效率提高,柱效可达几百万乃至几千万理论塔板数/m 以上。常用于蛋白质或多肽分离的有:毛细管区带电泳(CZE)、毛细管等电聚焦(CIEF)、胶束毛细管电动色谱(MECC)等<sup>[22]</sup>。

### 2.2 毛细管电泳-质谱联用技术

与 LC-MS 联用相比,CE-MS 联用技术在生命科学领域的应用尚处于起步阶段,其关键问题在于 CE 与 MS 的接口尚不能满足需要。主要原因是:(1)毛细管电泳的缓冲液通常是高离子强度、低挥发性,与质谱的兼容性较差;(2)二者的工作速度不匹配。现有的 CE-ESI-MS 接口可分为鞘流和无鞘流两种。目前,通常采用的仍是鞘流接口,而无鞘流液(sheathless)的接口是通过不锈钢管连接或插入微电极的方法来保证 CE 电流。最常用的毛细管电泳分离模式是 CZE,它可提供  $10^6$  理论塔板数/m 的柱效,峰容量超过 100。但事实上,在分离蛋白质或多肽时,用 CZE 很少分离出 100 个峰,可能是由于 CZE 在运行过程中所需缓冲液的特定 pH 所致。因为如果蛋白质的 pI 值与缓冲液的 pH 值相近,则会导致分辨率下降<sup>[23]</sup>。另外,CZE 分离多肽比分离蛋白质效果好,原因是多肽分子小,与毛细管壁作用小,吸附少,在电压、电渗流的驱动下可在毛细管中自由移动。最常见的毛细管电泳-质谱联用技术的应用模式是 CZE-MS。

在对复杂生物样品进行分析时,仅仅依靠 CE-MS 显然是不够的,必须加强预分离措施,常用的方法即是结合 HPLC 分离。Eriksson 等人<sup>[24]</sup>在 CE-MS 技术的基础上,结合离子交换色谱、亲和色谱,成功地从人胎盘中提取并鉴定出了胎盘碱性磷酸酶(PLAP)。Wittke 等人<sup>[25]</sup>把收集的尿液经  $C_2$  柱脱

盐、除去脲和电解质,将样品适当浓缩,先用 HPLC 粗分离,再用 CE-MS 分析,在健康人尿中发现了 1 000 种以上的蛋白质,经过对 18 名健康志愿者的测试,提出了一个包括 248 种多肽在内的正常尿中多肽参考名单。Neuhoff 等人<sup>[26]</sup>也用 CE-MS 的方法从肾小球肾炎病人尿中寻找疾病标志物,以健康人为对照组,发现了近 200 个差异蛋白质。这些成果显示了 CE 的高效分离与 MS 的高准确度、高分辨率结合,可获得强大的生命力。在做蛋白质的 X 射线晶体衍射时经常用到聚乙二醇,由于它在质谱鉴定过程中有很强的离子抑制作用,所以在聚乙二醇存在时的蛋白质鉴定是常见的一大难题。Shen 等人<sup>[27]</sup>在线联用毛细管区带电泳-电喷雾离子化源-三级四级杆质谱(CZE-ESI-triple Q-MS)研究了不同来源、不同浓度聚乙二醇存在下对马骨骼肌肌红蛋白鉴定的影响。他们采用施加给 CZE 一个持续不断的低电压辅助的方法来获得 ESI 的稳定性和重现性,结果显示采用此种技术路线第一次在高浓度聚乙二醇存在情况下实现了快速分析蛋白质,不仅简化了繁琐的样品预处理步骤,缩短了分析时间,还提高了实验的重现性和稳定性。

因为质谱对样品中盐的浓度要求苛刻,CE-MS 联用技术中电泳缓冲液、包层液的选择是十分关键的。Eriksson 等<sup>[28]</sup>以胰岛素、肌红蛋白、牛血清白蛋白(BSA)等标准蛋白质在 CE-MS 中的响应信号为依据,对比了磷酸盐、硼酸盐、甲酸胺和甲酸缓冲液作电泳液时对实验结果的影响,显示甲酸(50 mmol/L, pH 2.4)作电泳液时质谱对蛋白质的响应信号最好,而其他缓冲液对蛋白质离子化有抑制作用,同时证明了微量硼酸盐缓冲液(25 mmol/L, pH 8.5)对质谱的工作无不良影响。梁振等<sup>[29]</sup>则以两种小肽为例,探讨了缓冲体系和鞘液对质谱检测灵敏度的影响,结果证明这两种因素对质谱的影响不是独立的,而是相互关联的。

CE-MS 仪器系统的改造、毛细管电泳或质谱条件的优化也可显著提高蛋白质的分离效率,从而增加蛋白质鉴定的种类和可信度。Jensen 等人<sup>[30]</sup>把 CIEF 与 FTICR-MS 连接起来,对 *E. coli* 进行全蛋白质分析,从 300 ng 蛋白质溶液中得到相对分子质量在 2 000 ~ 300 000 的 1 000 个蛋白质,这种方法还有一个好处就是可利用多级质谱功能对一次未实现的分析进行二级或多级质谱分析,提高了分析的功率。Johnson 等人<sup>[31]</sup>改进了 CE-MS 系统,使 CE 与 MALDI-MS 也可实现离线联用,并用这种技术从人胎脑 cDNA(complementary DNA)文库表达的蛋白质酶解物中鉴定出 211 种肽,肽段匹配率达到了

25%~60%。之后他们还发明了一种小型胰酶反应装置,这种装置可置于普通用旧的毛细管中,解决了 CE-MS 联用技术中蛋白质在线酶解的难题,大大提高了分析速度和灵敏度,这种纳升级的酶解反应装置可使浓度在  $10^{-8}$  mol/L 以下的样品浓缩时间由数小时下降至几秒,消耗的样品很少(小于 5 fmol),而且提供多种分离系统和不同质谱的接口,还能使肽段达到完全匹配<sup>[32]</sup>。

### 3 其他分离新技术

#### 3.1 毛细管电色谱

近年发展起来的毛细管电色谱(capillary electrochromatography, CEC)是毛细管电泳与液相色谱的融合技术,由于它是采用电渗流来推动流动相,不仅克服了高效液相色谱中压力流本身不稳、流速不均匀引起的峰扩展,而且柱内无压降,使得峰扩展只与溶质的扩散系数有关,因而毛细管电色谱的理论塔板数远高于高效液相色谱。同时,由于引入了高效液相色谱的固定相,使毛细管电色谱具备了高效液相色谱的选择性。目前可采用常压和加压两种工作模式。与液相色谱相比,它可以采用更长的柱长、填充粒径更小的填料,所以分辨率也显著提高<sup>[33]</sup>。在多肽分析中毛细管电色谱的应用也越来越多,研究者不断致力于毛细管柱性能的改良,在标准肽和一种蛋白质酶解物的 CEC 分离中已创造出 50 000 理论塔板数/m 的分离效率<sup>[34]</sup>。在电色谱的工作模式和与检测器(紫外、质谱)联机方面的研究也有突破。Ivanov 等人<sup>[35]</sup>采用 CE-CEC-ESI-MS 方式分析了 BSA 酶解物,并对采用数据依赖的模式所获得的串联质谱数据进行了分析,仅用 5 min 即获得肽段匹配率达 73% 的可信结果。由于毛细管电色谱具有柱效高、分析速度快、成本低等优点,其与质谱联用在多肽分析中会得到越来越广泛的应用。

#### 3.2 微流控芯片(microfluid chip)

自从上世纪 90 年代 Manz 等<sup>[36]</sup>在平板微芯片上实现了毛细管电泳与流动注射分析以来,微型全分析系统(mini-aturized total analysis systems, TAS)或称芯片实验室(laboratory-on-a-chip, LOC)就因为代表着 21 世纪分析仪器走向微型化、集成化的发展方向而备受关注。微流控芯片是目前 TAS 领域中最活跃的发展前沿,它可将整个实验室包括采样、稀释、加试剂、反应、分离、检测等功能集成在晶体硅、玻璃、塑料等材质的一张芯片上完成,与传统实验室分析相比,微流控芯片具有成本低、分析速度快、所需样品和试剂少以及体积小等优

点<sup>[37]</sup>。早期的微流控芯片主要以毛细管电泳为分离手段,现在已经发展了以毛细管电泳分离为核心的液-液萃取、过滤、无膜扩散等多种分离手段,且主要液流驱动手段除了电渗流外,也出现了流体动力、气压、重力、离心力、剪切力等多种手段,具有相当大的发展潜力。目前,集成毛细管电泳芯片(integrated capillary electrophoresis chip)仍是微流控芯片的主流,直接针对蛋白质混合物分离的多维毛细管电泳芯片已有不少实验室研制成功<sup>[38,39]</sup>。最近, Wang 等人<sup>[40]</sup>在芯片上将毛细管等电聚焦微通道和毛细管电泳微通道用一个四通微流控阀的装置连接起来,避免了由于两性电解质溶液和高离子强度的电泳缓冲液的混合而造成的分离效率下降,且死体积很小,成功地分离了 4 种蛋白混合物。另外,根据微流控芯片原理制作的商业化的液相色谱与电喷雾质谱的接口也即将面市,而这些进步对于关注复杂样品分离的蛋白质组学研究者具有很大的吸引力。

### 4 结语

针对复杂的生物样品分析,分离是成功分析的首要 and 关键步骤。目前,作为应用广泛的、经典的双向凝胶电泳方法的重要补充,多维液相色谱-质谱联用技术因其克服了双向凝胶电泳的歧视效应、实现了分析的仪器化、自动化,在蛋白质组学领域引起高度重视并不断应用于工作实践,特别是不同模式色谱分离技术的联合应用将会发挥越来越重要的作用。另外,由于毛细管电泳、毛细管电色谱和集成毛细管电泳芯片等微量分离技术在灵敏度、分辨率、分析速度和成本方面的优点以及适合大规模和高通量分析的优势,使这些技术在蛋白质组学中正在或即将发挥重要作用。

#### 参考文献:

- [1] Venter J C, Adams M D, Myers E W, Li P W, Mural R J, Sutton G G, Smith H O, Yandell M, Evans C A, Holt R A, et al. *Science*, 2001, 291: 1 304
- [2] Quadroni M, James P. *Electrophoresis*, 1999, 20: 664
- [3] Wang H, Hanash S. *J Chromatogr B*, 2003, 787: 11
- [4] Yang Heyi, Ying Wantao, Qian Xiaohong. *Progress in Natural Science* (杨何义, 应万涛, 钱小红. 自然科学进展), 2002, 12(1): 13
- [5] Giddings J C. *J High Resolut Chromatogr*, 1987, 10(5): 319
- [6] Wall D B, Kachman M T, Gong S, Hinderer R, Parus S, Misek D E, Hanash S M, Lubman D M. *Anal Chem*, 2000, 72: 1 099
- [7] Zhu K, Kim J, Yoo C, Miller F R, Lubman D M. *Anal Chem*, 2003, 75(22): 6 209
- [8] Bauer S H, Wiechers M F, Bruns K, Przybylski M, Stuermer C A O. *Anal Biochem*, 2001, 298: 25

- [ 9 ] Lubman D M , Kachman M T , Wang H , Gong S , Yan F , Hamler R L , O 'Neil K A , Zhu K , Buchanan N S , Barder T J. *J Chromatogr B* , 2002 , 782 : 183
- [ 10 ] Wang Zhengfan , Yang Shumin , Wu Tian , Yue Weihua. *Coupling Technology of Chromatography*. Beijing : Chinese Chemistry Industry Press ( 汪正范 , 杨树民 , 吴天 , 岳卫华. 色谱联用技术. 北京 : 化学工业出版社 ) , 2001. 123
- [ 11 ] McDonald W H , Yates J R. *Current Opinion in Molecular Therapeutics* , 2003 , 5( 3 ) : 302
- [ 12 ] McDonald W H , Ohi R , Miyamoto D T , Mitchison T J , Yates J R. *International Journal of Mass Spectrometry* , 2002 , 219 : 245
- [ 13 ] Soreghan B A , Yang F , Thomas S N , Hsu J , Yang A J. *Pharm Res* , 2003 , 20 : 1 713
- [ 14 ] Leinweber F C , Schmid D G , Lubda D , Wiesmuller K H , Jung G , Tallarek U. *Rapid Commun Mass Spectrom* , 2003 , 17 : 1 180
- [ 15 ] Vollmer M , Nagele E , Horth P. *J Biomol Tech* , 2003 , 14 : 128
- [ 16 ] Wu S L , Amato H , Biringer R , Choudhary G , Shieh P , Hancock W S. *J Proteome Res* , 2002 , 1 : 459
- [ 17 ] Wu S L , Choudhary G , Ramstrom M , Bergquist J , Hancock W S. *J Proteome Res* , 2003 , 2 : 383
- [ 18 ] Cargile B J , Bundy J L , Grunden A M. *Anal Chem* , 2004 , 76 : 86
- [ 19 ] Shen Y , Tolic N , Masselon C , Pasa-Tolic L , Camp D G II , Hixson K K , Zhao R , Anderson G A , Smith R D. *Anal Chem* , 2004 , 76 : 144
- [ 20 ] Shen Y , Tolic N , Masselon C , Pasa-Tolic L , Camp D G II , Lipton M S , Anderson G A , Smith R D. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* , 2004 , 378 : 1 037
- [ 21 ] Shen Y , Jacobs J M , Camp D G II , Fang R , Moore R J , Smith R D , Xiao W , Davis R W , Tompkins R G. *Anal Chem* , 2004 , 76 : 1 134
- [ 22 ] Hu S , Dovichi N J. *Anal Chem* , 2002 , 74 : 2 833
- [ 23 ] Shen Y , Smith R D. *Electrophoresis* , 2002 , 23 : 3 106
- [ 24 ] Eriksson H J C , Somsen G W , Hinrichs W L J , Frijlink H W , de Jong G J. *J Chromatogr B* , 2001 , 755 : 311
- [ 25 ] Wittke S , Fliser D , Haubitz M , Bartel S , Krebs R , Hausadel F , Hillmann M , Golovko I , Koester P , Haller H , Kaiser T , Mischak H , Weissinger E M. *J Chromatogr A* , 2003 , 1 013 : 173
- [ 26 ] Neuhooff N , Kaiser T , Wittke S , Krebs R , Pitt A , Burchard A , Sundmacher A , Schlegelberger B , Kolch W , Mischak H. *Rapid Commun Mass Spectrom* , 2004 , 18 : 149
- [ 27 ] Shen J , Buko A. *Anal Biochem* , 2002 , 311 : 80
- [ 28 ] Eriksson J H C , Mol R , Somsen G W , Hinrichs W L J , Frijlink H W , de Jong G J. *Electrophoresis* , 2004 , 25 : 43
- [ 29 ] Liang Zhen , Duan Jicheng , Zhang Weibing , Zhang Yukui. *Chinese Journal of Chromatography* ( 梁振 , 段继诚 , 张维冰 , 张玉奎. 色谱 ) , 2003 , 21( 1 ) : 9
- [ 30 ] Jensen P K , Pasa-Tolic L , Anderson G A , Horner J A , Lipton M S , Bruce J E , Smith R D. *Anal Chem* , 1999 , 71 : 2 076
- [ 31 ] Johnson T , Bergquist J , Ekman R , Nordhoff E , Schurenberg M , Kloppel K D , Muller M , Lehrach H , Gobom J. *Anal Chem* , 2001 , 73 : 1 670
- [ 32 ] Cooper J W , Chen J , Li Y , Lee C S. *Anal Chem* , 2003 , 75 : 1 067
- [ 33 ] Krull I S , Sebag A , Stevenson R. *J Chromatogr A* , 2000 , 887 : 137
- [ 34 ] Johannesson N , Wetterhall M , Markides K E , Bergquist J. *Electrophoresis* , 2004 , 25 : 809
- [ 35 ] Ivanov A R , Horvath C , Karger B L. *Electrophoresis* , 2003 , 24 : 3 663
- [ 36 ] Harrison D J , Fluri K , Seiler K , Fan Z , Effenhauser C S , Manz A. *Science* , 1993 , 261 : 895
- [ 37 ] Fang Zhaolun , Fang Qun. *Modern Scientific Instruments* ( 方肇伦 , 方群. 现代科学仪器 ) , 2001 , ( 4 ) : 3
- [ 38 ] Herr A E , Molho J I , Drouvalakis K A , Mikkelsen J C , Utz P J , Santiago J G , Kenny T W. *Anal Chem* , 2003 , 75 : 1 180
- [ 39 ] Chen X , Wu H , Mao C , Whitesides G M. *Anal Chem* , 2002 , 74 : 1 772
- [ 40 ] Wang Y C , Choi M H , Han J. *Anal Chem* , 2004 , 76 : 4 426