

毛细管电泳用于金属硫蛋白形态分析最新动态*

薛洪宝 焦艳娜 庞国伟 李晖

(四川大学 化学工程学院 成都 610065)

摘要 金属硫蛋白是广泛存在于生物体内的低分子量、富含半胱氨酸、可被金属和其他因素诱导合成的细胞内金属结合非酶蛋白质。本文综述近些年来毛细管电泳法用于金属硫蛋白形态的研究进展现状,对毛细管电泳的分离模式、检测方法及联用情况进行概括,并对其广阔前景进行展望。优化金属硫蛋白的分离条件,选择高灵敏度、高结构信息量的复合联用检测手段,仍是今后研究的重点。

关键词 毛细管电泳 形态分析 金属硫蛋白

金属硫蛋白(metallothionein,简称MT)是一类广泛存在于生物界、低分子量、富含半胱氨酸、可被金属和其他因素诱导合成的细胞内金属结合非酶蛋白质。MT在生物体内有很重要的生理作用:清除体内自由基、防止机体衰老;解除重金属的毒性;参与体内微量元素的代谢;增强机体对各种不良状态的适应能力;锌元素的贮存库;防止细胞癌变等^[1]。研究MT与金属结合形态有利于了解生物体内非必需金属解毒,消除自由基抗衰老,必需微量元素金属元素储存运输等生理过程。

到目前为止,对于金属硫蛋白的研究很多,尤其是动物金属硫蛋白。研究这类物质的方法很多。总体看来,无非是寻找一种恰当的分离手段,并结合恰当的检测手段,也就是所说的联用技术,即有效分离手段和检测手段的复合连接组合。包括:高效液相色谱(HPLC)、离子色谱法(IC)、超临界流体色谱法(SFC)、气相色谱法(GC)和毛细管电泳(CE)等分离手段,所连接检测系统包括:电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)、光学发射光谱(OES)和微波诱导等离子体质谱(MIP-OES-MS)和直流等离子体((DCP)COES)和(MS)、石墨炉原子吸收(GFAA)、电化学技术等。就分离方法而言,CE有其他分离方法所不具有的优点:高分辨率、高速度、样品消耗量小,不破坏生物样品原始形态、生物活性,能真正做到活体分析;其理论塔板数为几十万每米,高者可达几百万甚至上千万每米,通常对实际复杂样品的分析较为理想,还可同时分离电泳淌度相似或差别不大的蛋白质的不同结合形态。鉴于以上优点,使其成为更适于蛋白质形态分析的一种新型分离技术。对于检测技术来说,光谱学方法最为普遍、电化学检测器经济实用、质谱(MS)检测

器灵敏度较高、免疫学分析在蛋白质样品分析中的作用也日益显著。本文对近20年来CE与各种不同检测手段:免疫分析法、光谱学方法、电化学法和质谱(MS)法等的联用在金属硫蛋白的形态分析中的应用进行评述。

1 金属硫蛋白简介

金属硫蛋白自从1957年Margoshes和Vallee^[2]从重金属镉蓄积的马肾中分离出后,已有40余年的历史。然而不同生物种中,MT在其体内产生原因和生理作用不尽相同。动物MT的表达受金属离子、激素、炎症等因素的调节,现在一般认为动物和真菌的MT参与重金属离子的解毒及金属离子的代谢^[3];还发现MT和一些脑部病变有关。植物MT基因的表达也受金属离子及其它因素,如糖饥饿、胁迫、激素、热激、损伤、病毒侵染、虫害等的影响。植物MT的功能目前尚不明确,由于它具有结合金属离子(如 Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} 等)的能力,因此认为它在解除重金属离子的毒害^[4]、维持组织中金属离子的稳定以及调节金属离子向特定组织的运输等方面起作用。另外,利用某些金属硫蛋白在发育过程中表现出程序表达的特点,通过改变 Zn^{2+} 浓度来调节金属硫蛋白,进而调控基因的表达。一些研究中还发现金属硫蛋白与植物的抗逆反应、胚芽发育、果实成熟、衰老等生理过程有关^[5-7]。

金属硫蛋白系列的共同特点是相对分子量低:约为6000~7000道尔顿,含有60~63个氨基酸残基;高金属含量,每分子蛋白可结合7个二价金属离子,如Cd, Zn等,或多至18个一价金属离子,如Cu, Ag等;蛋白中的所有半胱氨酸残基均以还原态出现,并与金属离子通过巯基键结合,从而具

*国家自然科学基金资助项目(No. 29877018)

有金属硫化化合物的光谱学特征。MT的光吸收特征除与它的氨基酸组成有关外,也与它所结合的金属种类密切相关^[8]。如Zn-MT在220nm高度吸收,而Cd-MT在250nm处高度吸收;全部的氨基酸残基中含有23%~33%的半胱氨酸残基,没有二硫键、芳香族氨基酸和组氨酸;半胱氨酸残基在全氨基酸序列中的分布保守性很强,这就使得研究其与金属作用情况成为可能。MT的存在形式及稳定性与它是否结合金属、所结合金属的种类及环境的pH密切相关,一般说来,金属硫蛋白本身以配位键等形式结合金属离子,构象坚固,热稳定性较其他蛋白质高;而对酸碱承受能力低,一般稳定存在的pH值区间在一个pH值单位左右,如果超出这个范围,就会有部分金属游离出来。

植物中金属硫蛋白和动物体内的金属硫蛋白有所不同,它们在空间结构上有较大的差异,根据文献中核磁共振测定的键合序列绘制大鼠肝脏MT-2的三维图(见图1),而植物金属硫蛋白^[20]的可能三维结构图(见图2)与之有较大差别,图2为豌豆根部MT-1。植物MT可以分为三类:I类MT的半胱氨酸残基(Cys-)按CC, CXC, CXXC的方式排列,集中分布在肽链的N端和C端;II类

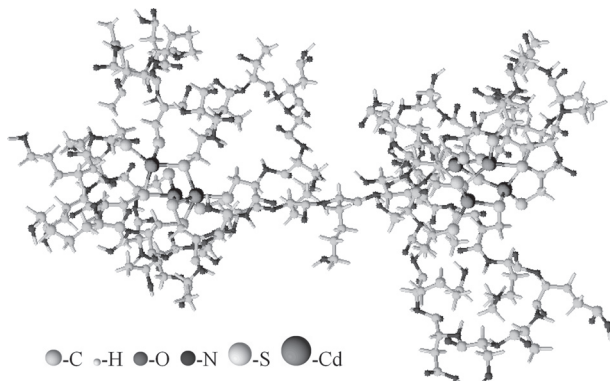


图1 哺乳动物金属硫蛋白(MT)的分子结构模型^[23]
 β . Domain, consist of 9 cysteine residues;
 α . Domain, consist of 11 cysteine residues

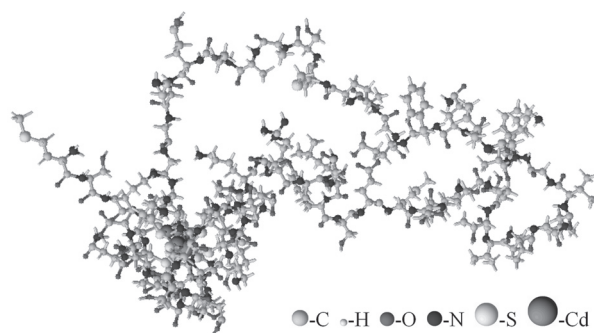


图2 植物金属硫蛋白的结构模型^[20]
 Consist of 12 cysteine residues

MT的Cys则散布在整个肽链中;III类MT又称为植物螯合剂(phytochelatines,简称PC),PC不是基因编码产物,是以谷胱甘肽为底物酶促合成的多聚物,富含Cys^[9]。

2 生物样品的预处理

不同的基体分析研究方法有所不同,组织、生物体液、细胞培养物这些复杂样品要设计开发切实可行的研究方案。传统的通过细胞液样品半纯化MT的方法即凝胶排阻色谱法^[10,11],用一些不同尺寸的凝胶分离,快速分离少量样品不太适用。

分离MT简便易行的方法还有以下三类:首先,因Cd,Zn等的MT热稳定性好,可以根据他们的热稳定性进行粗分离,以排除其他杂蛋白干扰,粗略估计,MT能承受60℃高温10min或100℃高温1min,温度、时间的选择不固定,还要根据所纯化的蛋白质质量大小。其次,含有复杂金属键合形式的MT不像其他蛋白质那样在低pH值容易变性,因为各种金属的稳定常数与pH值密切相关,因此,纯化MT时通常也可依靠调整pH值,通过它的调整能够有意识地改变蛋白质结构中的金属离子量,MT样品经酸性脱蛋白处理后就能够进行CE分析。再次,MT结构稳定,对有机溶剂耐受力较强,如:乙醇、丙酮、乙腈等,在50%的有机溶剂水溶液中也稳定存在,而很多别的蛋白质会在这样的条件下变性沉降,生物样品经有机溶剂处理脱杂蛋白后,接下来就是用生物凝胶色谱介质脱盐,此过程一般会导致分析样品的稀释,需要进一步的浓缩,在保证MT不变性的前提下至少要浓缩到80%,两步溶剂提取过程是从动物组织中大规模提取MT的常用方法,此方法更适合于MT半纯化及浓缩,同时也更适合于分析检测。

3 毛细管电泳的分类及在MT中的应用

CE是近十几年迅速发展起来的一种新型分离技术,应用范围广泛,主要用于分离不同的金属离子和各种无机阴离子等,并能进行复合体系的机理研究^[12]。也用于分离各种有机小分子及一些具有生物活性的大分子如多糖、核酸、蛋白质等。在蛋白质样品的制作与分离中,有许多其他方法不能取代的优点:样品消耗量小,峰容量高,灵敏度高,重现性高,通用性广等。具备丰富的分离模式:毛细管区带电泳(CZE)、胶束电动色谱(MEKC)、等速电泳(ITP)、聚丙烯酰胺涂层毛细管电泳等。

3.1 毛细管区带电泳及应用

用普通内壁未经修饰的熔融石英毛细管分离时,离子强度(IS)高有利于蛋白质与毛细管内壁发生作用,以提高分离效率,但过高的离子强度容易产生较大的焦耳热,因此,应选择恰当的离子强度。中性酸度的缓冲溶液因没有电渗流或电渗流很小而使分离效率更高些。对于MT异构体的分离,可以选用偏酸性或中性pH值的缓冲体系,如:磷酸盐及两性离子缓冲液。另外,可以在电泳缓冲溶液中加入表面活性剂或有机溶剂^[13],以减小毛细管内壁的一些硅醇基团和一些蛋白质的相互作用。为提高对MT的分离效果,Thore W. Wilhelmsena等人^[14]在分离马肾MT的两种形态时,通过在缓冲液中加入环糊精等添加剂,对毛细管内壁也做处理,涂聚丙烯酰胺涂层,并讨论不同添加剂种类及浓度对分离度的影响机制。

3.2 胶束电动毛细管电泳 (MECC) 及应用

在电泳缓冲溶液中加入表面活性剂十二烷基硫酸钠(SDS)能够得到较好的分离效果,主要原理就是胶束卷入分离体系中,在水溶性电解质溶液的亲水环境中形成表面带负电、中心有强疏水性的SDS胶团,分离过程主要决定于它们的亲水性及所带电荷的不同。SDS胶团尺寸大小恰好在5000道尔顿左右,与MT分子尺寸大小相近,它能有效拦截MT分子或与MT分子相互竞争,达到较好的分离。因而,在电泳分离过程中只需改变胶束浓度,不必改变缓冲溶液pH值等其他电泳条件就能够有较好的重现性。通常分离条件下,SDS的浓度在60~120mM,所用的毛细管为50cm×75μm未修饰的毛细管,300mM硼酸钠缓冲溶液,pH=8.4~10.4,分离电压10kV。

3.3 聚丙烯酰胺涂层毛细管电泳^[15]及应用

普通的熔融石英毛细管内壁可以经过修饰,以改变表面电性、水溶性、化学特性等。目前,最常用的商品化毛细管带有氨基修饰的带正电的酸性涂层,中性不带电涂层,各种亲水性、疏水性等涂层。对于MT异构体来说,中性不带电涂层能得到较好的分离效果。氨基修饰的带正电的酸性涂层毛细管更适合分离那些带正电的蛋白质,一般pH值应低于蛋白质的等电点(pI),但一些氨基修饰的毛细管不适合在pH<3.5的条件下测定MT,因理论上多数MT异构体的pI在4~4.5之间,极少数MT-1和MT-3在较大的范围,可能达到碱性范围,为能使被分离物都得到较好的分离,pH一般选中性或

偏碱性,最高可以达到8,应用高离子强度的磷酸盐作缓冲溶液,改进的内壁涂层^[16]还有聚乙烯亚胺和2-丙烯酰胺基-2-甲基丙磺酸共聚涂层等。Shunsuke Nakamura等人^[17]利用镉离子诱导鼠肝细胞,胞液中产生两种金属硫蛋白,并对其进行毛细管电泳研究,得知两种金属硫蛋白对重金属Cd、Cu等的解毒效果有所不同,所用的就是内壁经聚丙烯酰胺处理过的毛细管。

4 检测方法的选择

以前研究者建立许多专门分析方法并把它用于数量不断增长的MT分析中,许多年来的分析集中于外生物种的研究,然而近些年来,更关注于内生物种研究,如组织或生物体中金属蛋白质^[18],目前用于MT的定性、定量分析技术方法很多,能和毛细管电泳有效在线联用的主要包括以下几类:光谱学分析法、质谱法、电化学分析法等。这些方法也各有优缺点,根据不同检测需要,使用时要作恰当的选择。

4.1 光谱学分析法

光谱学分析法原理比较常用,主要是基于样品的不同波长下的吸收强度来定量的。检测MT紫外吸收是最常用^[19]、最经典的方法,G. Álvarez-Llamas等^[20,21]用CZE-UV分析研究兔肝脏的金属硫蛋白样品,Cd离子诱导下的鳗鱼体内金属硫蛋白及玉米种子中的金属硫蛋白样品,通过不同的紫外吸收强度比较样品中的两种MT与Cd的结合形态。为选择MT的较大吸收波长,并排除基体干扰,可以用二极管阵列检测器,进行波长时间扫描,以得到波长、时间-紫外吸收强度的二维电泳图,从而确定恰当的紫外吸收检测波长。由于CE样品用量很小,最低达到fmol级,对于实际生物样品UV检测限可能达不到要求,需要对样品富集放大。

荧光检测法也可以直接测定MT总量,主要是MT分子中所包含的巯基基团和荧光基团试剂发生反应,用N-[4-(二甲氨基-2-苯并咪唑基)苯基顺丁烯二酰亚胺](DBPM)联合凝胶过滤色谱法,用于鼠组织样品中MT及其类似物的分析,这种方法的线性关系很好和灵敏度很高。在MT的二维结构鉴定中拉曼光谱和红外光谱也是常用的重要手段,高宏等^[22]对金属硫蛋白(MT)进行分离,得到单一的MT-1和MT-2组份,并用傅立叶变换拉曼光谱(FT-RS)和傅立叶变换红外光谱(FT-IR)测定它们的二级结构,通过拉曼光谱位移和红外光谱吸收峰

研究 MT 主链的 α -折叠、 β -转角变化,发现不同亚型 MT 结构的区别主要表现在肽链骨架上,反应红外和拉曼谱中酰胺 I 带与酰胺 III 带的峰的位移、峰形和强度有所不同,而两种 MT 的金属簇结构无明显差异。

另外,核磁共振(NMR)在化学、生物、医药等领域有非常重要的用途。早在上个世纪 80 年代 NMR 就已经用于动物 MT 三维结构的分析,作为一种结构鉴定技术,和 MS 一样,被期望是高效分离方法的一种优良联用手段。CE 与 NMR 的联用方法已用于氨基酸、代谢药物等小分子的测定,此联用技术受灵敏度低、仪器过于昂贵等条件限制。随着仪器灵敏度的不断提高、超导 NMR 的广泛普及,CE-NMR 有望用于 MT 的三维结构解析及与金属亲和力的研究。此外,在生物样品中 MT 形态分析还有 X 射线衍射方法,用此法研究斑海豚肝脏中 Hg-MT 时发现^[4],肝脏中的 Hg 与 MT 结合,对肝脏无毒害作用,目前此类方法由于技术条件限制,未能与 CE 在线联用。

4.2 质谱法 (MS)

像 MT 这样的待测物,在形态分析的研究中发展软离子质谱法,也有更直接的方法——电喷雾离子化质谱法,这些都是研究金属硫蛋白的重要方法,可以不依靠保留时间而直接确定分子量大小,还可以直接确定同一样品中的金属硫蛋白中金属不同结合形态,以及异构体、次级异构体。而 MT 被金属离子饱和后形成的加合物可以通过 CE 和电喷雾离子化质谱^[23](ESI-MS)的在线联用来测定^[24]。MS 图谱解析运用量子化学计算方法,可以通过 MT 配合物体系中金属配合形态来确定 MT 的 α , β 结构域的性质^[18,24-27]。然而 MS 不能用于蛋白质的定量分析,主要是因为本身的技术条件限制。

目前发展的激光辅助基质解析质谱(MALDI-MS),已用于蛋白质组学领域研究,所测样品可以是生物材料、细胞培养物,并且有较高灵敏度,在其应用中为提高灵敏度可以采用微扩散接口技术。

MALDI-TOF-MS 由于样品用量小,既可以离线分析又可以在线分析,灵敏度高,因此可以用作 CE 的检测器来测定 MT 的二聚体和多聚体以及脱辅基蛋白、失活蛋白等^[28,29]。重复 CE 的分离结果,排除复杂杂质成分的干扰。

另外,还有电感耦合等离子体^[15,16,19,30]质谱用于在线联用检测 MT 的报导。Maria Montes-Bayon 等人^[31]用毛细管电泳和毛细管液相色谱两种方法

对兔肝的 Cd-, Cu-, Zn- 的两种金属硫蛋白的分离效果做比较,所用的检测器为电感耦合等离子体^[15,16,19,30]-碰撞室-质谱(ICP-CC-MS),此方法也能较好地分离出的两种金属硫蛋白进行有效检测。

4.3 电化学检测方法 (ECD)

检测 MT 总量的电化学检测方法,主要是基于 MT 中的硫醇基和金属离子的氧化还原性质不同:巯基和所键合金属离子的电学活性不同,产生不同的响应值。早期极谱法已用于研究 MT 脱辅基异构体和金属键合 MT 异构体,此法后来进一步改进成为不同脉冲的伏安法或恒流计时电势分析法,从而有效提高灵敏度,尽管高分子量的含巯基蛋白质很难移动,但线性范围还能达到 $0.31 \sim 8.06 \times 10^{-8}$ mol/L。经过后来的发展,采用阳极溶出伏安法,在 pH<2 条件下对 Cd-MT 进行分析检测。

不同脉冲模式阴极溶出伏安法也已用于 MT 的定量分析,铜可以取代键合在 MT 上的金属,和 MT 中的半胱氨酸残基形成高表面活性的亚铜离子配合物,这种亚铜离子配合物能吸附在滴汞电极表面,产生较强的还原信号,检测限能低至 2.00×10^{-10} mol/L。检测 MT, Zn-MT, Cd-MT 可以用此方法,用三苯基膦氧化膜覆盖的汞电极代替前面提到的工作电极,以控制 MT 的吸附,提高检测的重现性,这一检测过程检测限可以达到 8.90×10^{-10} mol/L。电分析化学方法检测 MT 总浓度可以达到很高的灵敏度,然而需要提高样品纯度,主要是因为许多电活性杂质干扰分析,也限制电分析技术用于某些实际生物样品的定量分析。

电化学检测和 CE 的典型联用仪器是芯片 CE,主要是电化学检测的制作方法容易融入芯片 CE 的制作过程中,通过刻蚀的方法就可以完成电化学检测和芯片毛细管电泳的集成制作,所使用的电极是微电极,微电极连接高频电导检测器。此仪器已用于蛋白质的检测,PMMA 芯片和玻璃芯片电泳已用于蛋白质的免疫分析^[32]。电化学检测中的安培检测技术,具有比紫外检测更高的灵敏度,且仪器简单、价格成本低、线性范围宽、操作简便,所以其与毛细管电泳的联用在分析化学领域得到广泛的研究和应用^[33],也可以作为 MT 的检测方法。

5 主要困难

分析检测过程中最大的困难就是样品用量太小,达到 fmol 级,UV, RS 等检测手段达不到要求,需要对样品浓集放大,低离子强度的样品溶液

可以通过流体力学注射方法富集；在电解质溶液中可以通过高的电场强度富集溶质，蛋白质以高的速度在样品溶液中运动，当它达到电解质溶液界面时，而突然被减速富集从而导致界面处浓度高。此外，对于内壁未经修饰的毛细管，增大进样量也可以提高响应值，低离子强度下的电动负载进样比一般电解质溶液进样灵敏度要更高些。等速电泳 (ITP) 的在线预富集技术也是很好的方法，它的灵敏度和选择性更高。更简单一些的方法是在线固相萃取法 (SPE-CE) 分析 MT 异构体形态更普遍、经济，如果选择恰当的反相材料和分离条件，固相萃取法可以有效分离生物组织提取样品中的 100 种以上 MT 异构体，用化学修饰过的琼脂糖凝胶与 MT 交换萃取^[34]，至少能在 5min 内把 MT 浓度富集到 100 倍以上。

尽管 CE 或 HPLC 与各种先进的检测方法的联用，提高元素分析的灵敏度、降低检测限，通过它们的不同洗脱时间确定分子种类，得出的结果仍不够客观，也缺乏可供参考的文献资料^[35,36]。到目前有很多研究方法，但许多不能互相校正的方法用于有机体中 MT 的浓度的定量分析是不可靠的。这就使不同研究小组所获得的研究结果很难或者根本就不可能进行互比较。

6 结论

金属硫蛋白包含很多不同基因编码产物和谷胱甘肽为底物酶促合成的多聚物，使用高纯度的标准样品十分必要，MT 样品由于提纯过程中稳定性较小分子差，如：发生聚合、氧化、脱辅基、变性等

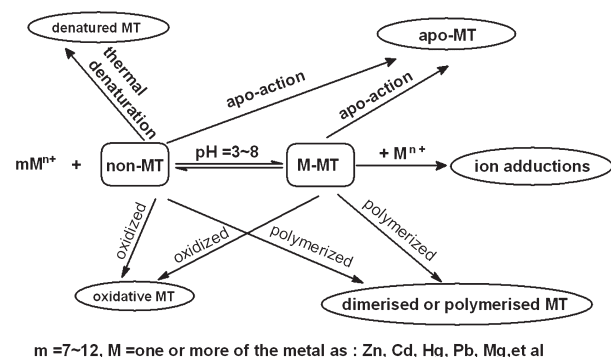


图 3 金属硫蛋白溶液主要成分

作用，而掺杂许多杂质。MT 溶液是一个复杂的平衡体系 (见图 3)，传统的电泳和色谱 (不包括反相高效液相色谱 (RP-HPLC)) 都能对它们进行有效分离。各种 CE 分离技术对这些 MT 异构体的分离速度很快，一般在 15min 以内完成，样品消耗量为 nL 级，并且有很高的分辨率和很好的重现性，并

结合改变电解质溶液的化学性质及对毛细管内壁的修饰能更好地分离很多结构类似的蛋白质样品。优化 MT 的分离条件，选择高灵敏度、高结构信息量的检测手段，如复合联用技术的使用 CE-UV-ESI-MS^[51]，得到不同 MT 的氨基酸序列，仍是研究重点。

参考文献

- Hu X R, Li H, Zhang Y X. Chinese Chem. Lett., 2004, 15(3): 326~329
- 蔡震峰 (Cai Z F), 任凤莲 (Ren F L). 应用化工 (Applied Chemical Industry), 2007, 36(2): 187~190
- M. Margoshes, B L Vallee. J. Am. Chem. Soc., 1957, 79: 4813~4814
- 雍政 (Yong Z), 何冰 (He B), 郭军华 (Guo J H). 解放军药学报 (Pharmaceutical Journal of Chinese People's Liberation Army), 2003, 19(4): 285~287
- Ng P S, Li H, Matsumoto K, et al. Proc. Japan Acad., Ser. B, 2001, 77 (9): 178~183
- Charbonnel-Campaa L, Lauga B, Combes D. Gene, 2000, 254: 199~208
- Nam Y W, Tichit L, Leperlier M, et al. Plant Mol. Biol., 1999, 39: 629~636
- Miller J D, Arteca R N, Pell E J. Plant Physiol., 1999, 120: 1015~1023
- 刘安玲 (Liu A L), 朱必凤 (Zhu B F). 韶关学院学报: 自然科学版 (Journal of Shaoguan University: Natural Science), 2001, 22 (3): 86~91
- 常团结 (Chang T J), 朱祯 (Zhu Z). 生物技术通报 (Biotechnology Bulletin), 2002, 3: 5~10
- Hu X R, Li H, Zhang Y X. Chinese Chem. Lett., 2004, 15(3): 326~329
- Nordberg G F, Nordberg M, Piscator M, et al. Biochem. J., 1972, 126: 491~498
- 刘勇 (Liu Y), 夏之宁 (Xia Z N), 李晖 (Li H). 分析化学 (Chin. J. Anal. Chem.), 2005, 33(12): 1733~1736
- Terabe S, Otsuka K, Ando T. Anal. Chem., 1985, 57: 834~841
- Wilhelmsen T W, Hansen B H, Holten V, et al. J. Chromatogr. A., 2004, 1051: 237~245
- Haselberg R, Jong G J, Somsen G W. J. Chromatogr. A., 2007, 1159: 81~109
- Wang Z, Prange A. Anal. Chem., 2002, 74, 626~631
- Nakamura S, Kawata T, Nakayama A, et al. Biochem. Bioph. Res. Co., 2004, 320: 1193~1198
- Chassaigne H, Vacchina V, Lobinski R. TrAc-Trends Anal. Chem., 2000, 19(5): 300~313
- Balbina A, José B, Victoria S N. Electrophoresis, 2006, 27, 3661~3670
- Alvarez-Llamas G, Rodriguez-Cea A, de la Campa M R F, et al. Anal. Chim. Acta., 2003, 486: 183~190
- Labra M, Gianazza E, Waitt R, et al. Chemosphere, 2006,

- 62: 1234~1244
- 22 高宏 (Gao H), 周群 (Zhou Q), 郁鉴源 (Yu J Y). 光散射学报 (Chinese Journal of Light Scattering). 2001, 13(1): 16~20
- 23 Sun A M, Li H, Huang Z M, et al. Chinese Chem. Lett., 2004, 15(9): 1071~1074
- 24 van Vyncht G, Bordin G, Rodriguez A R. Chromatographia., 2000, 25: 745~752
- 25 Dabrio M, Van Vyncht G, Bordin G, et al. Anal. Chim. Acta., 2001, 435(2): 319~330
- 26 Chassaigne H, Lobinski R. Analyst, 1998, 123: 2125~2130
- 27 Chassaigne H, Lobinski R. J. Chromatogr. A., 1998, 829 (1-2): 127~136
- 28 Guo X, Chan H M, Guevremont R, et al. Rapid Commun. Mass Spectrom., 1999: 13, 500~507
- 29 Haselberg R, J. de Jong G, Somsen G W. J. Chromatogr. A., 2007: 1159, 81~109
- 30 Garcia J S, Magalhães C S, Arruda M A Z. Talanta, 2006, 69: 1~15
- 31 Montes-Bayon M, Profrock D, Sanz-Medel A, et al. J. Chromatogr. A., 2006, 1114: 138~144
- 32 陈义 (Chen Y). 毛细管电泳技术及应用, 第二版 (Technology and Application of Capillary Electrophoresis, 2nded), 北京: 化学工业出版社 (Beijing: Chemical Industry Press), 2006
- 33 吕金 (Lǚ J). 毛细管电泳—安培检测联用技术及其应用研究 (Study on Technique and Application of Capillary Electrophoresis with Amperometric Detection)D. 上海: 华东师范大学 (Shanghai: East China Normal University), 2006
- 34 Kabzinski A K. Biomed. Chromatogr., 2000, 14(3): 160~165
- 35 PolÇec K, Mounicou S, Chassaigne H, et al. Cell. Mol. Biol., 2000, 46(2): 221~235
- 36 Infante H G, Sanchez M L F, Sanz-Medel A. J. Anal. At. Spectrom., 2000, 15(5): 519~524

Capillary electrophoresis is used for the latest development of speciation analysis of metallothionein

Xue Hongbao Jiao Yanna Pang Guowei Li Hui

(College of Chemical Engineering, Sichuan University, Chengdu 610065)

Abstract Metallothionein is one of proteins that has low molecular weight, very high cysteine content and can be induced by metal and other complications. This protein is ubiquitous in the organism, in which has metal-bond and non-enzyme. The review summarized the status quo of analyzing metallothionein speciation by capillary electrophoresis in recent years. The use of capillary electrophoresis for metallothionein isoforms in separation model, detect strategies and hyphenated systems was reviewed. In the future, metallothionein will be investigated by capillary electrophoresis mainly focused on optimizing experiment conditions, choosing high sensitivity hyphenated methods to obtain multiple structure information. 82 references were cited.

Key words Capillary electrophoresis Speciation analysis Metallothionein

(上接第3页)

Scanning ion conductance microscopy and its applications in nanobiology.

Zhang Yanjun

(1. Tianjin Institute of Medical Equipment, AMMS, Tianjin 300161)

(2. National Academy of Nanotechnology & Engineering, Tianjin 300457)

Abstract The development of scanning probe microscopy (SPM) has opened up a new era of life science and has been used to develop a family of related methods that allow studying of cell structure and function on nanometer scale. Scanning ion conductance microscopy (SICM) is a new member of such SPM family and can be used to obtain high-resolution non-contact images of the surface of live cells under physiological conditions, and hence allows the relationship between cell microstructure and function to be probed. In this review, we concisely introduce the principles of SICM and its applications in nanobiology.

Key words Scanning probe microscopy Scanning ion conductance microscopy Nanobiology