

凝胶电泳与激光剥蚀-电感耦合等离子体质谱联用测定 蛋白质中微量元素的应用进展

王颖², 郭艳丽^{1, 2*}, 袁洪林^{1*}, 魏永锋², 闫宏涛², 陈慧慧²

1. 大陆动力学国家重点实验室, 西北大学地质学系, 陕西 西安 710069

2. 西北大学合成与天然功能分子化学教育部重点实验室, 西北大学化学与材料科学学院, 陕西 西安 710069

摘要 介绍了凝胶电泳(GE)和激光剥蚀-电感耦合等离子体质谱(LA-ICP-MS)联用测定蛋白质中微量元素的方法, 对蛋白质分离、凝胶处理, 包括染色及干燥, 和检测过程中的定量校正等技术问题做了详述, 并综述了 LA-ICP-MS 在硒蛋白、磷酸化蛋白及金属蛋白分析中的应用, 指出了这种方法在蛋白质中微量元素检测中存在的问题和发展方向。

关键词 激光剥蚀-电感耦合等离子体质谱(LA-ICP-MS); 凝胶电泳(GE); 硒蛋白; 磷酸化蛋白; 金属蛋白; 微量元素

中图分类号: O657.6 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2012)01-0223-06

引言

微量元素(P, Fe, Cu, Zn, S等)具有重要的生物学功能, 它们作为活性中心或结构中心, 参与构成了三分之一左右的蛋白质和50%~70%的酶而发挥元素主要的生理生化功能, 对保持蛋白的结构、功能和稳定性不可或缺^[1, 2]。各种微量元素在生物体内都具有一定的浓度范围, 过量或缺乏都对机体有害。随着分析技术的不断发展, 可通过测定生物组织或细胞中微量元素的含量及分布状况, 从微观角度上获取关于细胞代谢、疾病发生等过程整体而全面的认识, 这引起了研究者的广泛关注。

激光剥蚀-电感耦合等离子体质谱(LA-ICP-MS)是20世纪90年代迅速发展起来的固体微区原位分析技术, 可以对固体样本中微量元素及超痕量元素直接进行定量分析并且提供同位素组成信息。目前, 此项技术已成功的应用于地质、材料、环境、海洋、核工业研究及公安法医等领域^[3], 同时也成为生命科学强有力的研究手段之一, 可作为成像技术测定生物组织和细胞中元素含量及分布状况^[4], 也可用于分析头发^[5]、血液^[6]、牙齿^[7]中的元素含量。LA-ICP-MS技术分析生物样本时的优点主要包括^[8, 9]: (1)需要样品量少; (2)

可进行实时、快速检测; (3)检测限低($0.001 \sim 1 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$); (4)空间分辨率较好, 可达到微米级别。在蛋白质分析中, LA-ICP-MS有望替代传统放射自显影技术, 对经过一维(1D)或二维(2D)凝胶电泳分离后的蛋白质条带或斑点进行直接、快速地多元素测定, 成为近年蛋白质检测技术的研究热点。

1 LA-ICP-MS 原理与仪器

激光剥蚀-电感耦合等离子体质谱(LA-ICP-MS)是将激光剥蚀微量采样技术应用于 ICP-MS, 可直接对固体样品采样分析, 突破了常规溶液样品 ICP-MS 分析的局限性, 消除了水和酸所引起的多原子离子干扰, 提高了进样效率, 而且可以对痕量样品准确取样, 增强了 ICP-MS 的实际检测能力。其基本原理是将激光光束聚焦于样品表面使之熔蚀气化, 由载气将剥蚀下来的微粒载入到等离子体中电离, 再经质谱系统分析检测, 如图1所示^[10]。

在激光剥蚀-电感耦合等离子体质谱(LA-ICP-MS)体系中, 根据应用范围及自身特点的不同可将常用的质谱仪分为三种: 四级杆质谱仪、扇形磁场质谱仪和飞行时间质谱仪。四级杆分析器具有快的扫描时间和相对较小、低消耗及稳定

收稿日期: 2011-07-25, 修订日期: 2011-11-16

基金项目: 国家自然科学基金项目(40973011), 陕西省自然科学基金资助项目(2010JM2022)和西北大学大陆动力学国家重点实验室科技部专项经费项目(BJ11070)资助

作者简介: 王颖, 女, 1987年生, 西北大学化学与材料科学学院在读硕士研究生 e-mail: 6687400@163.com

* 通讯联系人 e-mail: guoyl-123@hotmail.com; hlyuan@263.net

的分析系统,是生命科学研究中经常使用到的质谱仪。扇形磁场 ICP-MS 的最大优点是可以克服常规四级杆 ICP-MS 中存在的一些多原子离子干扰问题,其检出限一般比四级杆系统低 10 倍或更多,并且具有较高的灵敏度。飞行时间质谱仪可以在不到 50 μs 内采集整个质量范围内的数据,因此适用于对瞬时信号进行研究,灵敏度较四级杆质谱仪低。

使用最为广泛的激光器是钕铝石榴石(Nd:YAG)激光器,它的基础波长为 1 064 nm,由于红外激光技术存在精密度差和元素分馏效应严重的缺点,研究发现可通过使用倍频发生器将其波长二倍频(532 nm)、四倍频(266 nm)或五倍频(213 nm)转化为紫外输出,从而大大改善了透明样品的剥蚀能力,使激光器的分析性能有了显著的改善。目前使用较多的是 Nd:YAG 的四倍频(266 nm)(Nd:YAG 4th Harmonic)和 Nd:YAG 的五倍频(213 nm)(Nd:YAG 5th Harmonic)。准分子 193 nm ArF 激光系统在降低分馏效应等性能上更为优越,实际样品测量精密度可达到 1%~10%。此外,近几年发展起来的飞秒激光剥蚀系统(fs LA-ICP-MS)具有良好的剥蚀效率和极低的分馏效应,但因价格比较昂贵,使其应用受到限制。

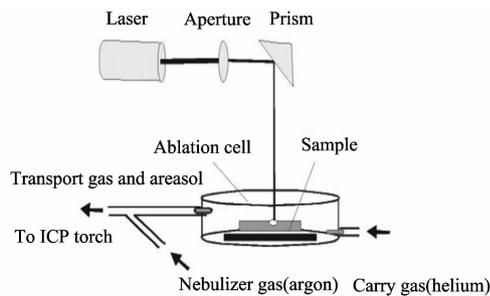


Fig. 1 Scheme of laser ablation system

2 分离与检测

LA-ICP-MS 作为一种元素质谱技术,通常与凝胶电泳(GE)联用来测定蛋白质中微量元素含量和同位素比值。图 2 为基于凝胶电泳分离蛋白质的元素质谱及生物质谱技术在分析人类脑组织时的流程图^[11]:生物样本首先经过凝胶电泳进行分离,对凝胶染色使蛋白质显现后,采用 LA-ICP-MS 对凝胶中蛋白质条带或斑点进行直接、快速地多元素测定,

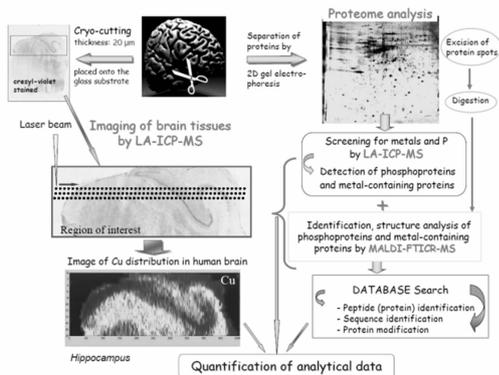


Fig. 2 Strategies of LA-ICP-MS in brain research

再使用胰蛋白酶消解余下的蛋白质,联用生物质谱,如:基质辅助激光解析/电离质谱(MALDI-MS)或电喷雾质谱(ESI-MS)进行蛋白质的识别和测序。使用 GE-LA-ICP-MS 法分析蛋白质时,为使凝胶中的蛋白质条带或斑点具有样品代表性,不仅需要凝胶电泳分离过程中保持蛋白质的完整性,而且应对分离后的凝胶进行适当处理,以使分析结果具有最佳的准确度、灵敏度和分辨率。

2.1 凝胶电泳分离

一维(1D)或二维(2D)聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)可根据蛋白质等电点和相对分子质量的不同分离蛋白质复合物,能区分存在于一个样品中的几千种蛋白质,是目前最有效的蛋白质分离技术^[12],已成功与 LA-ICP-MS 联用,应用于蛋白质中元素的定性或定量检测^[13, 14]。

根据凝胶电泳分离蛋白质的效果及待测元素的不同,可将蛋白质的分离方法大致分为两大类:一类是测定与蛋白质以共价键相结合的原子(如 P^[15-17] 和 Se^[18-21])时,由于其与蛋白质间的键合能力较强,通常是在还原或非还原条件下使用一维(1D)或二维(2D)十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)对生物样本进行分离。另外一类是分离金属蛋白时,由于金属元素与蛋白质间的作用力相对较弱,在分离过程中可能存在元素的流失,因此必须对分离条件加以严格控制:首先,分离金属蛋白时,最好在非变性条件下进行,故可采用非变性凝胶电泳法^[22-25],如蓝绿温和非变性凝胶电泳(BN-PAGE),这从很大程度上改善了变性凝胶电泳分离大多数金属蛋白时元素流失较为严重的缺点;其次,Jiménez^[24]指出分离时使用的电流大小也会对结果产生影响:电流越大,金属元素流失越严重;而且凝胶电泳电极缓冲液中的尾随离子会影响分离时蛋白质的移动和金属离子的稳定性。此外,分离过程中的其他因素(如环境因素:温度、蛋白浓度、压力、pH;蛋白质自身性质:一级结构、二硫键等)也可能对实验结果产生影响,需对其进一步研究,以获取使用 GE-IA-ICP-MS 分析蛋白质的最佳分离条件。

2.2 染色

使用 LA-ICP-MS 分析蛋白质中以共价键结合的原子时,通常先需使用染色技术对经凝胶电泳分离的聚丙烯酰胺凝胶进行染色,使其中的蛋白质条带或斑点显现出来再进行检测。目前,采用的方法主要包括考马斯亮蓝染色和银染。

然而,近期的研究表明,染色过程中会造成蛋白质中金属元素的流失,这可能因染色过程使用的强酸所引起^[23]。图 3^[25]分别比较了对非变性凝胶电泳分离后的凝胶进行染色(考马斯亮蓝染色和银染)和不经染色的碳酸酐酶(CA)中⁶⁸Zn,超氧化物歧化酶(SOD)中的⁶⁵Cu,转铁蛋白(TF)、血红蛋白(Hb)和肌红蛋白(Myo)中的⁵⁷Fe 的 LA-ICP-MS 检测结果,可以看到经染色后的蛋白质中金属元素均会出现不同程度的流失。因此, Raab 等^[24, 25]均建议在使用 LA-ICP-MS 测定金属蛋白前不对聚丙烯酰胺凝胶进行染色,但是这也对蛋白质的检测带来了困难。对此,可采取如下方案进行解决:对于 1D 凝胶电泳而言,可将待测样品重复两份进行分离,对其中一份进行染色,确定凝胶中蛋白质条带的位置,使用 LA-ICP-MS 采用线性扫描模式对未经染色的另一聚丙烯

酰胺凝胶进行分析^[26]。或者是对整个凝胶剥蚀分析,进行金属成像,这种方法将在 2.3 节阐述,其缺点是分析过程花费

时间相对较长。

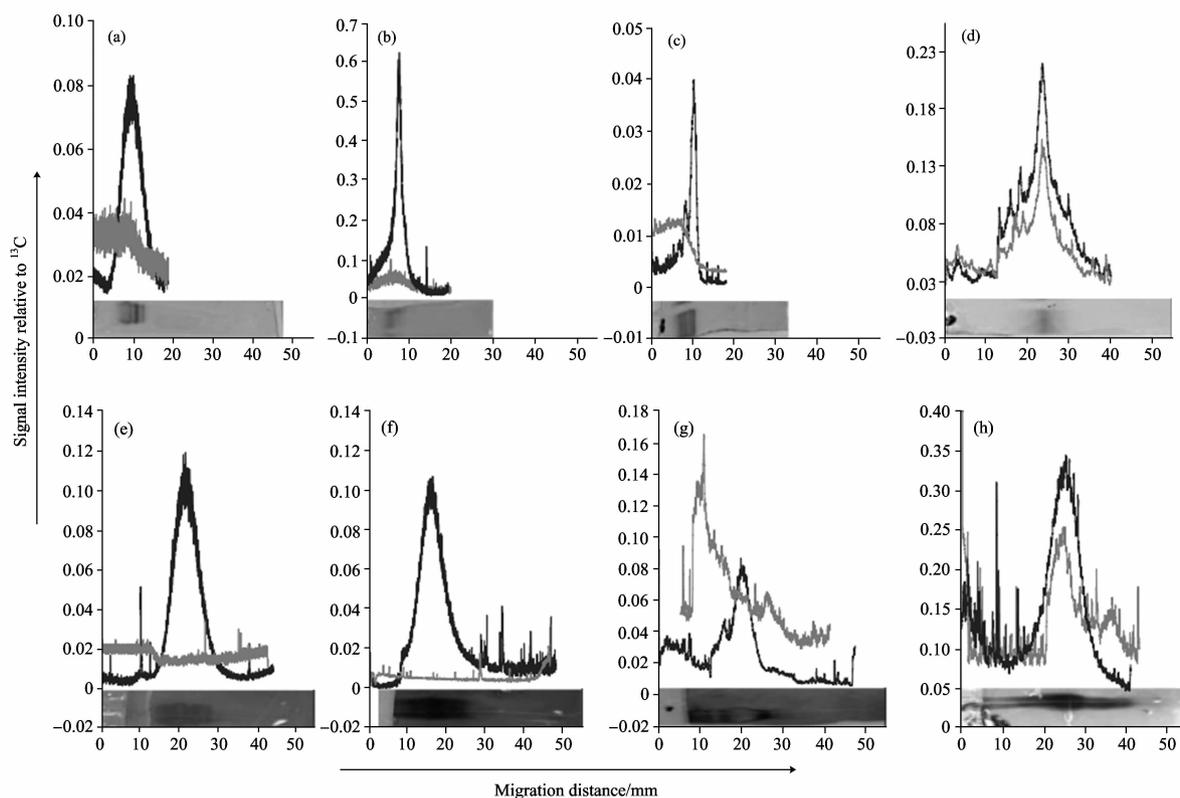


Fig. 3 LA-ICP-MS trace of standard proteins separated by non-denaturing GE without or after staining

Black; unstained gel, grey; stained gel. Gel images (A—D); Coomassie BioSafe; (E—H); silver stained. (A and E) ^{68}Zn -trace of CA; (B and F) ^{65}Cu -trace of SOD; (C and G) ^{57}Fe -trace of TF; (D) ^{57}Fe -trace of Hb; and (H) ^{57}Fe -trace of Myo

2.3 凝胶干燥

分离蛋白质复合物后的聚丙烯酰胺凝胶约含水 65%,为防止 LA-ICP-MS 分析过程中由于水分子不断挥发引起凝胶的变形或破裂而导致样品剥蚀的重现性降低,文献[27-29]指出在对蛋白质条带或斑点剥蚀采样前需先对凝胶进行干燥。

通常采用以下方法对分离蛋白质后的凝胶进行必要的处理:(1)将凝胶置于两块玻璃板间干燥后,移去上层玻璃板进行 LA-ICP-MS 分析^[30];(2)在分析金属蛋白时,Raab^[25]使用 100%甘油将凝胶浸泡一小段时间后,于 75 °C 干燥后进行分析,以使金属元素流失程度达到最小,得到的实验结果具有较好的灵敏度与较低的 RSD 值;(3)采用电印迹法或直接将已经分离的蛋白质转移至固相薄膜上^[21, 29, 31, 32],对薄膜进行剥蚀取样分析,省略掉凝胶干燥的步骤。(4)使用凝胶干燥机对凝胶进行处理^[33]。

2.4 校正

校正问题一直是 LA-ICP-MS 进行定量分析时遇到的难点问题之一。使用 GE-LA-ICP-MS 测定蛋白质中微量元素时,使用的校正方法包括外标法,内标法及具有应用前景的同位素稀释法。

外标校正法是 LA-ICP-MS 测定未知样品元素浓度的常

用方法。虽然目前国际公认的校正校准很多,如 USGS 系列玻璃标准参考物质及 NIST 人工合成硅酸盐玻璃标准参考物质等,但如果将其用于凝胶中元素的定量检测中会存在基体不匹配的问题。为消除基体效应的干扰,Chéry^[33]将空白凝胶浸泡于待测元素标准溶液中,制备了一系列浓度不同的凝胶,并将其作为外标,测定了红细胞及酵母中 Se 的含量。

随着生物质谱技术(MALDI-FTICR-MS)与元素质谱(LA-ICP-MS)的成功联用,使用蛋白质中天然存在的 S 作为内标元素的内标校正法,已经被用于蛋白质中微量元素的定量检测中^[34-36]。即在分析含硫的蛋白质时,可先使用 MALDI-FTICR-MS 测定蛋白质中半胱氨酸残基的数量获取 S 的浓度,将 S 作为内标元素,根据 LA-ICP-MS 结果中待测元素与 S 信号强度的比值计算得到蛋白质中元素的含量。这种校正方法不但可以补偿激光剥蚀过程中的一些不稳定因素的影响,而且还可以校正 ICP-MS 中的基体效应和信号漂移的问题,在蛋白质分析中得到广泛应用。

同位素稀释法(ID)是准确度非常高的一种校准方法,在定量分析样品中元素含量时具有许多优点,如分析结果很少受到信号漂移或基体效应的影响,样品制备期间元素的部分损失也不会影响结果的可靠性等,已被广泛用于检测地质^[37]、材料^[38]、土壤^[39]中元素含量。Deitrich 等^[26, 40]采用

特异性同位素稀释法(SS-IDMS)通过 1D GE-LA-ICP-MS 技术测定了生物样本中超氧化物歧化酶(SOD)的含量。实验中将⁶⁵Cu 和⁶⁸Zn 富集的标准作为示踪剂,加至待测生物样本中,通过测定标准 SOD 及牛肝脏提取物 SOD 中 Cu 和 Zn 同位素比值(Cu: 65/63; Zn: 68/64),对其含量进行了测定。尽管目前这种方法是被用于蛋白质的定量检测中,但这对使用同位素稀释法测定蛋白质中微量元素提供了一种新的思路。采用同位素稀释法对蛋白质分析时仍具有一定的局限性:首先,应确保富含同位素蛋白质的结构、化合价没有发生变化,在整个实验过程中与天然蛋白质具有相似的行为;同时,在待测蛋白质样本中,富含同位素蛋白质的待测元素与其他蛋白质不发生离子交换;此外,经凝胶电泳分离后的两个相邻的蛋白质条带间不会发生相互干扰和交叉污染。

3 应用

随着新仪器的开发及理论研究的不断深入,GE-LA-ICP-MS 被广泛应用于硒蛋白、磷酸化蛋白及金属蛋白中元素的定性定量检测中。

3.1 硒蛋白

硒是生物体必需的微量元素,主要以硒蛋白的形式参与调节各种生理环节、发挥不同生物功能。由于过量硒具有毒性,而适量硒则具有营养作用和对癌症的预防功能,使其正成为金属蛋白质组学中最受关注的研究方向之一。将凝胶电泳与激光剥蚀-电感耦合等离子体质谱技术(LA-ICP-MS)相结合已经成为一种高分辨率、高灵敏度的微量含硒蛋白的分离检测技术^[41]。

Fan^[42]使用 LA-ICP-MS 测定了污染场所水鸟胚胎和鱼卵的硒蛋白。此后,该技术又与一维或二维凝胶电泳技术结合用于酵母及非洲鲶鱼中硒含量的测定^[19, 21]。为保证凝胶中蛋白质条带过斑点具有样品代表性,防止含硒蛋白中硒代氨基酸尤其是硒代半胱氨酸(Sec)链的降解,在对生物样本进行凝胶电泳分离前,需先进行 SDS 变性和碘乙酸衍生化处理。在 LA-ICP-MS 测定过程中作为载气的氩气(⁴⁰Ar ⁴⁰Ar)也会干扰⁸⁰Se 及其同位素的测定,应用动态反应池(DRC)能有效解决这一问题。此外,由于蛋白质中硒含量较低而且硒化合物电离能相对较高,会导致硒的检测限不理想,Ballihaut^[43]提出使用 fs LA-ICP-MS 对硒蛋白进行检测,随着到达 ICP 中蛋白质样品量的显著增多,其信号的灵敏度与 ns LA-ICP-MS 相比增加了 40 倍。在采用 LA-ICP-MS 测定凝胶中硒蛋白时,可通过检测¹³C⁺, ²³Na⁺ 和¹⁰⁷Ag⁺ 的变化来示踪样品剥蚀过程:样品中高¹⁰⁶Ag⁺ 信号来源于银染,可证明剥蚀发生在蛋白质位点;由于二维凝胶塑料衬背¹³C⁺ 和²³Na⁺ 的密度较凝胶中低,其信号强度的降低则表明凝胶已被完全剥蚀。在对硒蛋白进行定量测定时,可采用标准溶液法进行校准^[43],也可使用经硒标准溶液浸泡过的凝胶作为标准物质定量测定生物样品中的硒^[33]。

3.2 磷酸化蛋白

蛋白质磷酸化是生物体内最为普遍的调节方式,其磷酸化和去磷酸化这一可逆过程在许多生物学过程,如细胞信号

转导、细胞分化和细胞生长等的调控中起着重要的作用,被形象的描述为细胞生理活动的分子开关。蛋白质磷酸化的分子机制几乎涉及到所有的生理病理过程,如光合作用、细胞的生长发育、糖代谢、神经递质的合成与释放、包括癌变等,使之当之无愧地成为了生命科学研究及医药领域中的热点。

与传统检测磷酸化蛋白的放射性标记法相比,GE-LA-ICP-MS 具有所需样品量少,灵敏度与精确度高等优点。使用 GE-LA-ICP-MS 测定蛋白质中磷含量时,为防止磷酸酶的去磷酸化作用,通常要在生物样本的离析和裂解过程中加入磷酸酶抑制剂。在 ICP-MS 分析³¹P 时,遇到的最大问题是多原子粒子干扰,如⁵N¹⁶O⁺, ¹⁴N¹⁷O⁺, ¹⁴N¹⁶O¹H⁺ 在 *m/z* 为 31 处都具有较高的信号强度,为分离这些干扰,需要采用分辨能力较高(*m/Δm*~4 000)的双聚焦扇形磁场电感耦合等离子体质谱(ICP-SFMS)^[36],或使用动态反应池(DRC)技术,通过检测³¹P¹⁶O⁺ 分子离子来对 P 含量进行测定^[44]。在量化 LA-ICPMS 数据时,可采用 S 作为内标元素,通过内标校正法测定蛋白质中 P 和其他元素的含量^[19]。联用 MALDI-FTICR-MS 对凝胶中经酶解后的蛋白质进行检测,可进一步研究其结构和磷酸化位置。

LA-ICP-MS 可直接快速对凝胶中蛋白质条带或斑点中元素进行定量分析,但是由于凝胶及试剂中杂质 P 的背景信号强度相对较高,有时候很难识别蛋白质中磷的元素信号,使检测受到限制。

3.3 金属蛋白

除了测定与蛋白质以共价键相结合的元素 P 和 Se 外,LA-ICP-MS 也可被用于检测金属蛋白中的金属元素(如:Cu, Fe, Zn, Mn, Co, Cr, Cd 等),引起了金属蛋白质组学研究者的广泛关注。

目前,LA-ICP-MS 已经被广泛用于动植物组织内金属蛋白的测量中。如将 GE-LA-ICP-MS 与 MALDI-FTICR-MS 联用,使用 S 作内标元素,可用于检测阿尔茨海默病患者及正常人脑蛋白样本中的 Cu, Zn, Al, Fe, S, Si 和 P 含量^[35, 45]。使用富集稳定同位素⁶⁵Cu, ⁶⁷Zn 和⁵⁴Fe 作为示踪剂,则可进一步对阿尔茨海默患者脑蛋白中含有 Cu, Zn, Fe 的蛋白形成进行分析^[46, 47]。此外,Polatajko^[49]也将非变性凝胶电泳与 LA-ICP-MS 联用检测了植物 *Spinacia oleracea* L. 中含有 Cd 和 Zn 的金属蛋白,研究了在 *Spinacia oleracea* L. 内重金属元素的运输及其与蛋白质的键合能力。

正如上文所提到的,由于金属蛋白中金属元素与蛋白质的键合能力较差,文献^[49, 50]已经指出在使用 GE-LA-ICP-MS 检测金属蛋白质时可能存在元素的流失,使对金属蛋白的检测受到限制。研究表明,使用非变性凝胶电泳是分离蛋白质复合物的有效方法。Jiménez^[24]分别对含 Cu 和 Zn 的超氧化物歧化酶(SOD)和含 Zn 的乙醇脱氢酶(ADH)在变性(SDS-PAGE)和非变性凝胶电泳(BN-PAGE)下进行分离并对 LA-ICP-MS 结果比较后,证实了使用变性凝胶电泳分离蛋白质时存在金属元素的流失。Becker^[51]使用非变性凝胶电泳技术(BN-PAGE)对小鼠肾脏及肝脏样品中的金属蛋白进行了分离,使用 LA-ICP-MS 定性检测了蛋白质中的 Zn, Cu, Fe, Ni, Cr, Cd, Pb, 并使用 MALDI-TOF-MS 进行了蛋

白质的识别。对凝胶进行金属成像也是解决元素流失问题的方法之一。Becker^[23]首次通过使用 LA-ICP-MS 对凝胶进行成像,检测了小鼠肾脏组织蛋白中金属元素。蛋白质提取物经 2D-BN-PAGE 分离及银染后,采用双聚焦扇形磁场电感耦合等离子体质谱对选择的凝胶碎片(大约为几平方厘米)的整个表面进行连续的线剥蚀采样。采用 S 作为内标元素,对蛋白质中⁶⁴Zn⁺,⁶³Cu⁺,⁵⁷Fe⁺,²⁰⁸Pb⁺,⁵⁵Mn⁺进行了测定,以等电点和分子量分别作为 X 和 Y 轴,使用 MATLAB 6.5 软件根据元素的 LA-ICP-MS 信号强度绘制图像。图 4 展示了凝胶中的两个富含 Cu 和 Zn 凝胶的元素分布状况。检测发现凝胶中金属元素的分布大部分与蛋白质斑点存在一定联

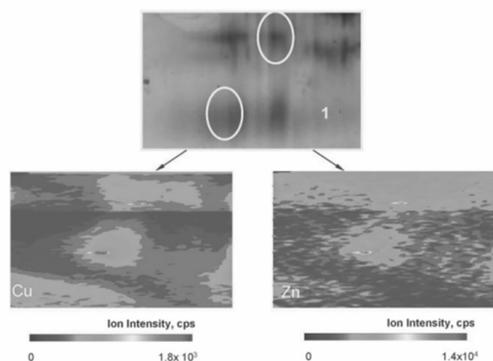


Fig. 4 Cu- and Zn-containing protein spots in section 1 of 2D-BN gel of rat kidney water extract

系,但并不完全重叠。使用凝胶成像法可对蛋白质中金属元素进行全面分析,而无需考虑凝胶中蛋白质的含量及分布状况。

4 结论与展望

激光剥蚀-电感耦合等离子体质谱(LA-ICP-MS)作为一种无机元素分析技术,具有原位、实时、快速的分析优势和多元素同时检测、灵敏度高、空间分辨率好等特点,同凝胶电泳(GE)联用后,可对蛋白质中微量元素含量和同位素比值进行测定。目前,已被用于硒蛋白、磷酸化蛋白及金属蛋白分析检测中。与生物质谱(基质辅助激光解析/电离质谱(MALDI-MS)或电喷雾质谱(ESI-MS))结合,可进一步对蛋白质进行识别和多肽序列测定,这将在蛋白质组学研究中具有潜在广泛的应用价值。

尽管如此,在使用 LA-ICP-MS 测定蛋白质过程中仍然存在一些问题,如在检测前需要对生物样本中蛋白质提取物进行凝胶电泳分离、染色、干燥等一系列预处理,在这些过程中可能会造成元素的损失和凝胶表面断裂等。特别是对于金属元素而言,由于其与蛋白质间的键合作用较小,损失程度可能更为严重,这就需要对影响因素进一步研究,对实验方法进行优化。另外,由于一些蛋白质中待测元素含量极低,要谨防来自缓冲溶液和凝胶的污染,以保障所获得信息的质量。

References

- [1] Hasnain S S. J. Synchrotron Radiat., 2004, 11: 7.
- [2] Szpunar, J. Anal. Bioanal. Chem., 2004, 378: 54.
- [3] Yuan H L, Gao S, Dai M N, et al. Chemical Geology, 2008, 247: 100.
- [4] Hare D, Tolmachev S, James A, et al. Anal. Chem., 2010, 82: 3176.
- [5] Dressler V L, Pozebon D, Mesko M F, et al. Talanta, 2010, 82: 1770.
- [6] Sussulini A, Kratzin H, Jahn O, et al. Anal. Chem., 2010, 82: 5859.
- [7] Stadlbauer C, Reiter C, Patzak B, et al. Anal. Bioanal. Chem., 2007, 388: 593.
- [8] Becker J S, Breuer U, Hsieh H F, et al. Anal. Chem., 2010, 82: 9528.
- [9] ZHENG Ling-na, WANG Meng, WANG Hua-jian, et al(郑令娜,王 萌,王华建,等). Progress in Chemistry(化学进展), 2010, 22(11): 2199.
- [10] Hu S, Zhang S, Hu Z, et al. Anal. Chem., 2007, 79: 923.
- [11] Becker J S, Becker J S, Zoriy M V, et al. Eur. J. Mass Spectrom., 2007, 13: 1.
- [12] Garfn D E. TrAC, Trends Anal. Chem., 2003, 22: 263.
- [13] Becker J S, Zoriy M, Becker J S, et al. Phys. Stat. Sol. (C), 2007, 4: 1775.
- [14] Becker J S, Zoriy M, Becker J S, et al. J. Anal. At. Spectrom., 2007, 22: 736.
- [15] Krüger R, Kübler D, Pallisse R, et al. Anal. Chem., 2006, 78: 1987.
- [16] Becker J S, Zoriy M, Michael P, et al. International Journal of Mass Spectrometry, 2007, 261: 68.
- [17] Wind M, Feldmann I, Jakubowski N, et al. Electrophoresis, 2003, 24: 1276.
- [18] Ballihaut G, Pecheyran C, Mounicou S, et al. Trends Anal. Chem., 2007, 26: 183.
- [19] Ballihaut G, Tastet L, Pecheyran C, et al. J. Anal. At. Spectrom., 2005, 20: 493.
- [20] Chassaing H, Chéry C C, Bordin G, et al. J. Anal. At. Spectrom., 2004, 19: 85.
- [21] Pedrero Z, Madrid Y, Cámara C, et al. Anal. At. Spectrom., 2009, 24: 775.
- [22] Binet M R, Ma R, McLeod C W, et al. Anal. Biochem., 2003, 318: 30.
- [23] Becker J S, Lobinski R, Becker J S. Metallomics, 2009, 1: 312.
- [24] Jiménez M S, Rodríguez L, Gomez M T, et al. Talanta, 2010, 81: 241.

- [25] Raab A, Pioselli B, Munro C, et al. *Electrophoresis*, 2009, 30: 303.
- [26] Deitrich C L, Braukmann S, Raab A, et al. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2010, 397: 3515.
- [27] Evans R D, Villeneuve J Y. *J. Anal. At. Spectrom.*, 2000, 15: 157.
- [28] Allardyce C S, Dyson P J, Abou-Shakra F R, et al. *Chem. Comm.*, 2001, 24: 2708.
- [29] Feldmann I, Koehler C U, Roos P H, et al. *J. Anal. At. Spectrom.*, 2006, 21: 1006.
- [30] Marshall P, Heudi O, Bains S, et al. *Analyst*, 2002, 127: 459.
- [31] Venkatachalam A, Koehler C U, Feldmann I, et al. *J. Anal. At. Spectrom.*, 2007, 22: 1023.
- [32] Jakubowski N, Waentig L, Hayen H, et al. *J. Anal. At. Spectrom.*, 2008, 23: 1497.
- [33] Chéry C C, Günther D, Cornelis R, et al. *Electrophoresis*, 2003, 24: 3305.
- [34] Becker J S, Zoriy M, Krause-Buchholz U, et al. *J. Anal. At. Spectrom.*, 2004, 19: 1236.
- [35] Becker J S, Zoriy M, Becker J S, et al. *Anal. Chem.*, 2005, 77: 5851.
- [36] Krause-Buchholz U, Becker J S, Zoriy M, et al. *Int. J. Mass Spectrom.*, 2006, 248: 56.
- [37] Boulyga S F, Heumann K G. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2005, 383: 442.
- [38] Fernández B, Claverie F, Pécheyran C, et al. *Anal. Chem.*, 2008, 80: 6981.
- [39] Yang C K, Chi P H, Lin Y C, et al. *Talanta*, 2010: 1222.
- [40] Konz I, Fernández B, Fernández M L, et al. *Anal. Chem.*, 2011, 83(13): 5353.
- [41] Hera I L, Palomo M, Madrid Y. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2011, 400: 1717.
- [42] Fan T W M, Pruszkowski E, Shuttleworth S. *J. Anal. At. Spectrom.*, 2002, 17: 1621.
- [43] Ballihaut G, Claverie F, Pécheyran C, et al. *Anal. Chem.*, 2007, 79: 6874.
- [44] Bandura D R, Ornatsky O I, Liao L. *J. Anal. At. Spectrom.*, 2004, 19: 96.
- [45] Becker J S, Zoriy M, Becker J S, et al. *J. Anal. At. Spectrom.*, 2004, 19: 149.
- [46] Becker J S, Zoriy M, Pickhardt C, et al. *Int. J. Mass Spectrom.*, 2005, 242: 135.
- [47] Becker J S, Zoriy M, Przybylski M, et al. *J. Anal. At. Spectrom.*, 2007, 22: 63.
- [48] Polatajko A, Azzolini M, Feldmann I, et al. *J. Anal. At. Spectrom.*, 2007, 22: 878.
- [49] Ma R, McLeod C W, Tomlinson K, et al. *Electrophoresis*, 2004, 25: 2469.
- [50] Chery C C, Moens L, Cornelis R, et al. *Pure Appl. Chem.*, 2006, 78: 91.
- [51] Becker J S, Mounicou S, Zoriy M V, et al. *Talanta*, 2008, 76: 1183.

Progress in Combination of Gel Electrophoresis and Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry for Trace Elements Determination in Proteins

WANG Ying², GUO Yan-li^{1,2*}, YUAN Hong-lin^{1*}, WEI Yong-feng², YAN Hong-tao², CHEN Hui-hui²

1. State Key Laboratory of Continental Dynamics, Department of Geology, Northwest University, Xi'an 710069, China
2. Key Laboratory of Synthetic and Natural Functional Molecule Chemistry of Ministry of Education, College of Chemistry and Materials Science, Northwest University, Xi'an 710069, China

Abstract Laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS) has become a very efficient and sensitive trace, ultratrace, and surface analytical technique for the in situ study of the concentration and distribution of the elements in life sciences with high spatial resolution. It is being used more and more frequently in biological, medical materials and protein research, which will lead to a better understanding of physiology and pathology process in cells and tissues. The present review mainly introduces the strategies of combination of gel electrophoresis (GE) with LA-ICP-MS for the quantification of trace elements in proteins, including the proteins separation, elements detection and calibration methods. The paper emphasizes the basic conditions of the proteins separation, focusing on the stability of proteins during GE and the treatment methods of staining and drying of the gel to enable successful detection of the elements by LA-ICP-MS. In addition, the application of GE-LA-ICP-MS in phosphoproteins, selenoproteins and metal-binding proteins is introduced in detail. The prospects and challenge for this technique are discussed as well for further study.

Keywords Laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry; Gel electrophoresis; Selenoproteins; Phosphoproteins; Metal-binding proteins; Trace elements

* Corresponding author

(Received Jul. 25, 2011; accepted Nov. 16, 2011)