



基于 MALDI-MS 高效检测血清中 FFAs 技术方法的开发创新实践

姜丽艳, 徐 阳, 杜映达, 董洪举

(吉林大学 生命科学学院, 长春 130012)

摘要: 游离脂肪酸(FFAs)在人体生理活动中扮演着至关重要的角色, 且作为肿瘤检测标志物具有灵敏性和特异性的显著优势, 准确测定血清中 FFAs 的含量对科学研究以及临床诊断具有非常重要的意义。本研究基于基质辅助激光解吸质谱仪(MALDI-MS)和刺激响应分子印迹膜(Sr-MIM)技术的优势和局限, 开发出一种新型的针对血清中 FFAs 的快速、高选择性、高通量的分析检测方法, 为 MALDI-MS 检测复杂样品中小分子化合物的痕量分析提供了新思路; 同时, 拓宽了大型仪器的应用范围, 有利于提高大型仪器优势资源共享效率; 进一步深入应用于大学生创新训练项目, 激发学生学术兴趣和创新能力, 提升拔尖创新人才培养质量, 营造自由创新的科研生态环境。

关键词: 基质辅助激光解吸质谱仪; 刺激响应分子印迹膜技术; 游离脂肪酸; 技术开发; 创新实践

中图分类号: G642.0

文献标志码: A

DOI: [10.12179/1672-4550.20230277](https://doi.org/10.12179/1672-4550.20230277)

Development and Innovation of Technical Methods for Highly Detection FFAs in Serum Based on MALDI-MS

JIANG Liyan, XU Yang, DU Yingda, DONG Hongju

(College of Life Science, Jilin University, Changchun 130012, China)

Abstract: Free fatty acids (FFAs) play a vital role in human physiological activities, and as tumor detection markers, FFAs have significant advantages in sensitivity and specificity. It is of great significance for accurate determination of FFAs in serum for scientific research and clinical diagnosis. This study develops a new detection method of rapid, highly selective and high-throughput analysis for FFAs in serum based on the advantages and limitations of matrix assisted laser desorption-mass spectrometer (MALDI-MS) and stimuli responsive molecularly imprinted membrane (Sr-MIM) technology. The technique provides a new idea for the trace analysis of small molecular compounds in complex samples by MALDI-MS. At the same time, it broadens application scope of large instruments, which is conducive to improving the sharing efficiency of advantageous resources. It has been deeply applied in college students' innovation training programs to stimulate students' academic interest and innovation potential, improve the quality of training top-notch innovative talents, and create a free and innovative scientific research ecological environment.

Key words: MALDI-MS; Sr-MIM; FFAs; technological development; innovative practice

游离脂肪酸又称非酯化脂肪酸, 在人体生理活动中扮演着至关重要的角色。近年来, 多项医学研究表明血清中 FFAs 的含量变化与恶性肿瘤、冠状动脉疾病、高血压、糖尿病等多种疾病存在着密切联系^[1-2], 一些重要的 FFAs(如棕榈酸等不饱和脂肪酸)含量的异常变化也可以作为病情诊断和发展的参考依据^[3], 已有报道证实, FFAs 作为肿瘤标志物的灵敏度和特异性明显优于 CEA、

CA19-9 等传统肿瘤标志物, 且以其含量在肺癌治疗过程中的明显变化作为判据可以比临床影像学的观察提前 6~16 周^[4]。可见, 准确测定血清中的 FFAs 含量对科学研究以及临床诊断具有非常重要的意义。由于 FFAs 在血清中的含量很低, 且血清的成分十分复杂, 这就对检测方法的选择性及仪器的灵敏度提出了很高的要求, 因此, 建立一种经济、快速、高选择性的针对血清中 FFAs 的检测

收稿日期: 2023-05-27; 修回日期: 2024-03-30

基金项目: 吉林省自然科学基金面上项目(20230101155JC); 吉林大学实验技术项目(2024 年)。

作者简介: 姜丽艳(1983-), 女, 博士, 高级工程师, 主要从事生物质谱的测试及功能开发方面的研究。E-mail:

jiangliyan@jlu.edu.cn

手段是十分必要的。

基质辅助激光解吸质谱仪(MALDI-MS)已被广泛应用于多肽、蛋白、核酸等生物大分子以及人工合成的高分子聚合物的检测。MALDI具备诸多优势的同时也面临着一些挑战。由于MALDI分析中使用了过量的有机小分子基质,使其在质谱的低分子量区间产生复杂并且强度很大的离子加合峰,不但会抑制分析物峰的强度,有时也会出现基质和分析物相互作用形成复杂的加合离子而使谱图复杂化的现象,从而限制了MALDI-MS在小分子($m/z < 800$)检测领域的应用^[5]。同时,也限制了大型仪器在科学研究中的应用,降低了大型仪器资源共享的效率,更难于延伸应用于本科生的实践教学。因此,如何有效降低在低分子量区基质和其他杂质对于样品峰的干扰,已经成为当今MALDI-MS小分子分析领域的研究重点。本文研究拟开发一种MALDI-MS高效检测血清中FFAs的技术方法,具有快速、超高选择性、高通量检测的创新优势,使复杂样品中的小分子化合物的痕量分析成为可能。

1 技术方法的开发及创新优势

分子印迹膜(molecular imprinting membrane,

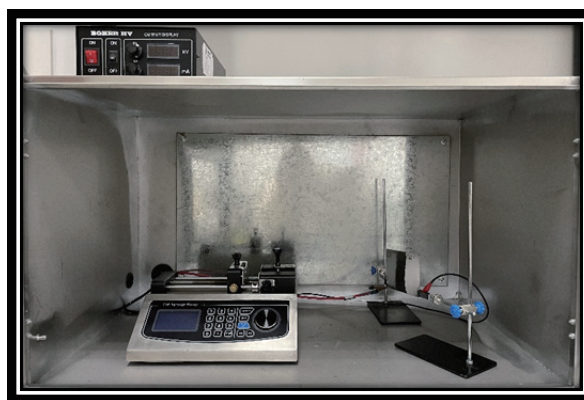
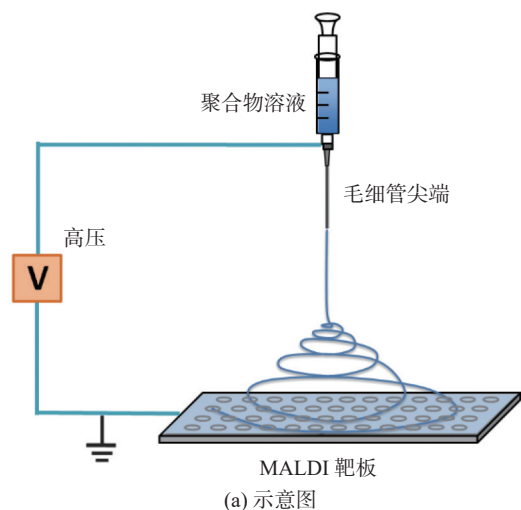


图1 静电纺丝装置图

1.2 刺激响应分子印迹纺丝膜的制备

采用高压微波辅助制备不同类型的刺激响应分子印迹聚合物微球(Sr-MIPs),将模板分子、功能单体按一定比例在二甲基亚砜中进行自组装,再依次加入二甲基丙烯酸乙二醇酯(EGDMA)和N,N-亚甲基双丙烯酰胺(MBA)双交联剂、苯乙

MIM)技术是一种将分子印迹技术和膜分离技术相结合,可以对特定分子进行高选择性分离的技术^[6]。它不仅具有分子印迹技术的预定性、选择性和实用性,也具有膜分离技术的节能性、易操作性和连续性的优点^[7]。刺激响应分子印迹膜(Sr-MIM)是将分子印迹膜分离技术与刺激响应性材料结合得到的一种新型的分子印迹材料,能够根据外界刺激(温度、光、pH等)来实现对模板分子的吸附和释放行为,进而实现与样品基质的高效分离,且具有很好的识别性能,模板去除容易,并且过程是可逆的^[8]。Sr-MIM具备分子印迹膜特有的分离速度快、印迹位点可接近性高等优点,因此在样品处理领域具备更加广阔的应用前景^[9]。基于Sr-MIM和MALDI-MS技术的各自优势和局限,本文研究拟将两种技术相结合,开发出一种新型的针对血清中FFAs的快速、高选择性、高通量的分析方法。

1.1 静电纺丝装置的搭建

自行搭建的静电纺丝装置示意图和实物图如图1所示。装置包括高压电源、注射泵、恒温恒湿箱、接收器等零件,均为自买或自制^[10]。相比传统纺丝装置最主要的改进是直接将MALDI靶板作为纺丝材料的接收板,用于MALDI-MS的检测。

烯、引发剂和N-异丙基丙酰胺(NIPAM)温敏功能单体。随后将混合溶液加入SDS水溶液中,并加入适量稳定剂。在冰浴中采用超声粉碎机制得细乳液后转移至高压微波反应釜中聚合1h,最后用乙酸甲醇溶液去除模板分子,得到温敏Sr-MIPs。将聚丙烯腈(PAN)或聚己内酯(PCL)加入装有

N, N-二甲基乙酰胺(DMF)的锥形瓶中, 加热搅拌至 DMF 全部溶解, 随后加入适量 Sr-MIPs 并搅拌均匀, 得到分子印迹纺丝液, 再利用图 1 所示的

静电纺丝装置进行纺丝, 即得到单模板 Sr-MIM, 制备流程如图 2 所示, 修饰有 Sr-MIM 的 MALDI 靶板如图 3 所示。

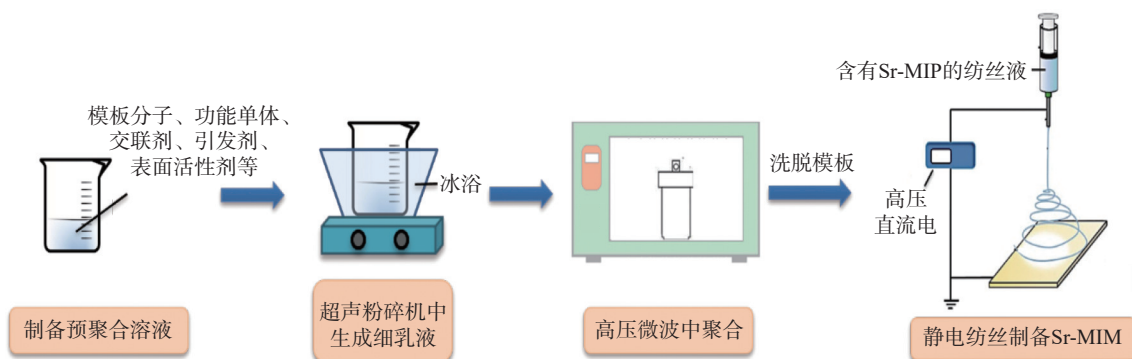


图 2 Sr-MIM 的制备流程

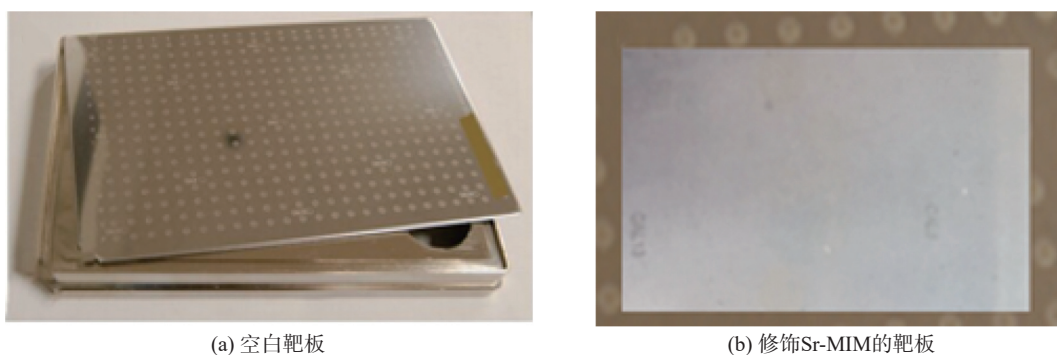


图 3 Sr-MIM 的纺制效果图

1.3 Sr-MIM 的表征

以棕榈酸为模板, 制备得到 Sr-MIM, 并利用静电纺丝技术将其直接修饰在 MALDI 靶板上, 采用扫描电子显微镜(scanning electron microscopy, SEM)对 Sr-MIM 的微观形貌进行了初步的表征, 从图 4 可以看出, Sr-MIPs 已经成功地交联在纺丝纳米纤维体系中, 且分布较均匀。

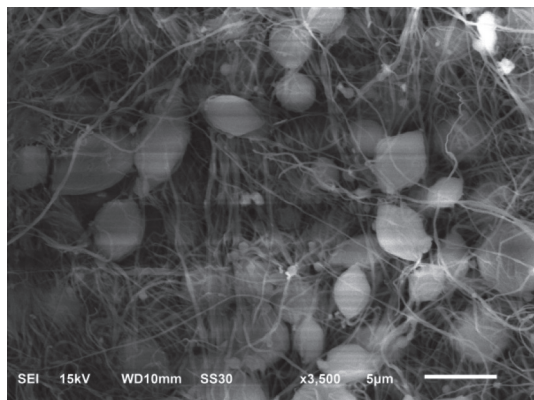


图 4 Sr-MIM 的 SEM 表征

1.4 建立对血清中 FFAs 的快速、高通量的分析方法

以昆明小鼠血清中的 FFAs 为检测对象, 将修饰在 MALDI 靶板表面的 Sr-MIM 作为吸附介质用于血清中的 FFAs 的萃取和富集, 无须介入其他分离手段, 只需将通过简单预处理的血清样品连同基质滴加至 MALDI 靶板上, 将目标化合物进行原位洗脱后, 直接送入 MALDI-MS 质谱进行检测, 对 FFAs 进行分析, Sr-MIM 靶板 MALDI-MS 的分析流程如图 5 所示。

考察样品体积、萃取时间、基质的种类和用量以及滴加完样品所需的平衡时间等因素对于测定结果的影响, 并优化各项质谱条件。最后对实验进行相关的方法学评价, 包括测定线性范围、检出限、精密度、回收率等相关数据。

1.5 Sr-MIM 的可行性验证分析

为了考察 Sr-MIM 检测 FFAs 的可行性, 应用 Sr-MIM 测试了多种 FFAs 的混合物, 检测结果如

图6所示。由图的质谱图可见, 采用 Sr-MIM 检测 6 种 FFAs 的混合物时, 待检测的 6 种脂肪酸都得到了很好地识别, 并且分辨率极高, 几乎没有小分子基质峰的干扰。可见, Sr-MIM 用于检测 FFAs 具有一定的可行性。

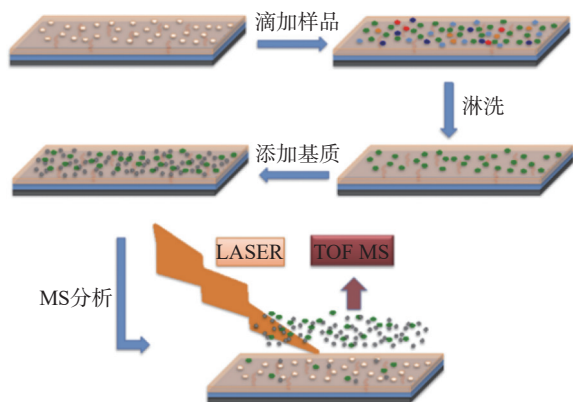


图5 Sr-MIM靶板MALDI-MS的分析流程

1.6 血清中棕榈酸的检测

棕榈酸(palmitic acid, PA)是一种最常见的饱和脂肪酸, 被广泛运用于食品加工行业^[11]。而且棕榈酸作为一种机体内最丰富的饱和脂肪酸, 脂毒性作用较强, 非脂肪组织的细胞长期暴露于较高浓度的PA, 会刺激细胞脂质积累, 引起细胞出现脂毒性, 导致肝细胞、胰岛 β 细胞等多种细胞

的功能受损^[12], 所以本文研究首选棕榈酸作为 FFAs 检测的研究对象。

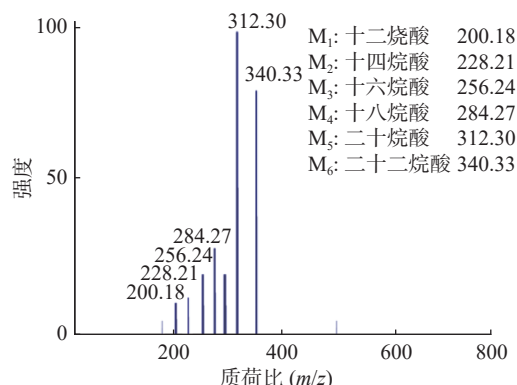
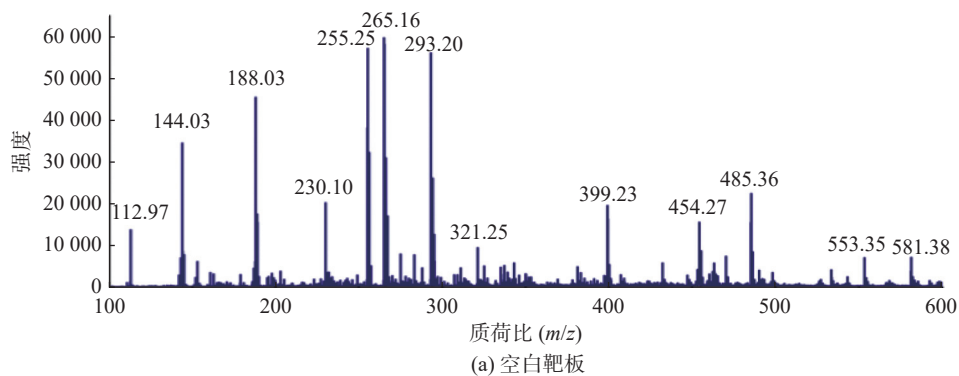
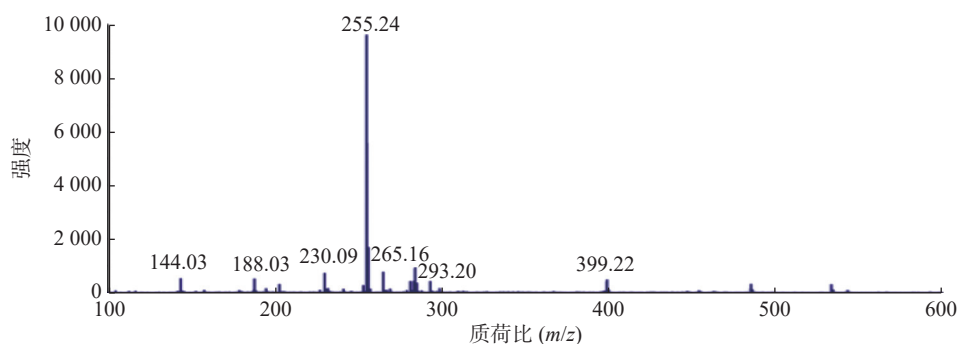


图6 Sr-MIM对6种FFAs的检测效果

分别考察了空白靶板和经 Sr-MIM 修饰的靶板对含有棕榈酸的小鼠血清和人血清的检测效果, 小鼠血清中棕榈酸的测定结果如图7所示, 人血清中棕榈酸的测定如图8所示。与传统方法相比, 修饰了 Sr-MIM 的 MALDI 靶板, 如图7(b)和图8(b)显示, 血清中棕榈酸小分子杂质的干扰大幅度降低, 测试的信噪比明显提高, 棕榈酸(m/z 255)的相对检测丰度明显提高。可见, Sr-MIM 与 MALDI-MS 联合应用于血清中棕榈酸的检测具有高选择性的创新优势。



(a) 空白靶板



(b) 修饰Sr-MIM的靶板

图7 小鼠血清中棕榈酸的测定

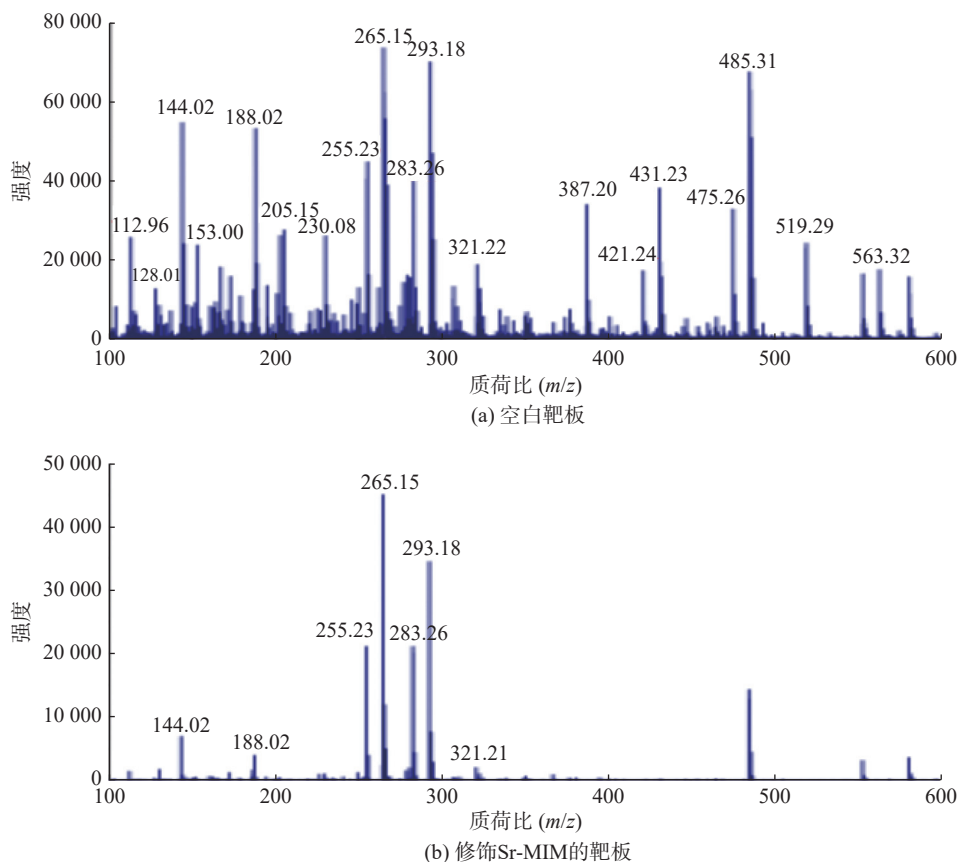


图 8 人血清中棕榈酸的测定

2 实践应用效果分析

MALDI-MS 高效检测血清中 FFAs 技术方法的开发, 充分发挥质谱分析与分子印迹膜技术的优势, 既减少了测试样品预处理的繁琐, 又提高了质谱对小分子检测的精确性, 在整个复杂样品分析的科学研究领域具备广阔的发展前景和应用价值。同时, MALDI-MS 的高通量检测, 也满足了科学研究中对样品快速分析的要求, 在生物医学的研究领域也展现广泛的应用和推广价值。同时, 该技术方法已经成功延伸应用于生命科学本科生的“大学生开放创新训练项目”和“开放创新实验项目”中。利用具有应用价值的实验项目设定问题, 引发学生产生疑问、深入思考、开展探究。经过学生的不断探索, 不仅继续拓宽研究制备了光敏型刺激响应分子印迹纺丝膜, 而且还将刺激响应分子印迹膜的方法延伸应用到了环境水中抗生素类药物的检测中, 并取得了较好的实验效果。通过对该技术内容的探索性创新, 培养了学生独立、自主的探究性创新意识, 增强了学生的创新能力, 激发了学生的科研

创新兴趣, 为培养创新型国家建设需要的高水平创新人才具有显著的推进作用。可见, 该实验技术方法的开发对科学研究、人才培养和社会服务都具有重要的意义。

3 结束语

通过自行搭建的静电纺丝装置, 制备刺激响应分子印迹膜, 并将该技术成功应用于血清中 FFAs 的 MALDI-MS 的检测中, 充分发挥了刺激响应分子印迹材料卓越的吸附性能, 不仅提高了 FFAs 的分离效率, 而且解决了质谱分析小分子化合物时存在的离子化效率低、检测特异性低等“卡脖子”问题。该技术具备针对性(对于目标物的专一性吸附)和普通性(可以根据实际需要更换模板分子), 为复杂样品中的小分子化合物的痕量分析领域提供了可靠的实验分析依据。此外, 新型分子印迹材料的制备方法简单环保, 并且可以重复利用, 在经过实验室条件优化后可以进行批量生产, 具备十分可观的成果转化前景。

(下转第 33 页)