

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

董娅妮, 方 群

(浙江大学微分析系统研究所, 浙江 杭州 310058)

摘要 :重点介绍了近年来国内外在微流控芯片毛细管电泳法用于蛋白质分离分析方面的研究进展。按照分离模式的不同,综述了各种应用于蛋白质分离的微流控芯片毛细管电泳系统,讨论了抑制芯片中的蛋白吸附的各种方法,并展望了芯片毛细管电泳系统在蛋白质分离领域的发展前景。引用文献 47 篇。

关键词 :微流控芯片 ;毛细管电泳 ;蛋白质分离 ;综述

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2008)03-0269-05 栏目类别 :专论与综述

Developments of microfluidic chip-based capillary electrophoresis for protein separation

DONG Yani, FANG Qun

(Institute of Microanalytical Systems, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract : In this paper, the developments of microfluidic chip-based capillary electrophoresis (CE) for protein separation in recent years are reviewed. Various chip-based CE systems for protein separation based on different CE separation modes are introduced. The approaches to suppress the adsorption of proteins on the surface of microchannel on chips are discussed. The application prospect for chip-based CE in protein separation is also proposed. Forty-seven references are cited.

Key words : microfluidic chip ; capillary electrophoresis (CE) ; protein separation ; review

20 世纪 90 年代初,Manz 和 Widmer 等^[1]首次提出了以微机电加工技术(microelectromechanical systems, MEMS)和分析化学为基础的微全分析系统(miniaturized total analysis systems, μ TAS)的概念。1992 年,Manz 等^[2]首次报道了基于微流控芯片的高效高速毛细管电泳(CE)分离系统。近年来该技术发展迅速,在蛋白质、脱氧核糖核酸(DNA)等生物大分子的分离分析中表现出了显著的优越性。当前,随着蛋白质组研究的深入和发展,如何实现蛋白质快速高效的分离成为需要解决的重要问题。在芯片上进行蛋白质的毛细管电泳分离可以显著地提高分析速度和分离效率,因此,这一研究方向引起了广泛关注,已有较多论文发表。本文对采用微流控芯片毛细管电泳进行蛋白质分离的分离模式、特点及其蛋白质吸附问题进行了介绍。

1 微流控芯片毛细管电泳的特点

芯片毛细管电泳技术将常规的毛细管电泳操作

在芯片上进行,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。它与常规毛细管电泳的分离原理相同,因此在分离生物大分子样品方面具有优势。此外,与常规毛细管电泳系统相比,芯片毛细管电泳系统还具备分离时间短、分离效率高、系统体积小且易实现不同操作单元的集成等优点^[3-6]。芯片毛细管电泳的上述优点使其成为蛋白质分离分析中的重要手段之一。

Rodriguez 等^[7]曾分别在常规毛细管、短毛细管和玻璃芯片上,以区带电泳的分离模式,对人免疫球蛋白 G(IgG)和荧光素异硫氰酸酯(FITC)的反应混合物进行分离,以比较 3 种系统的分离性能。使用有效分离长度为 35 cm 的长毛细管和有效分离长度为 6 cm 的短毛细管时,其分离时间分别为 335 s 和 84 s,理论塔板数分别为 27 750 和 41 816。当使用有效分离长度仅为 2.8 cm 的玻璃芯片时,分离时间缩短至 16 s,理论塔板数达到 49 000。由

收稿日期 2008-02-19

第一作者:董娅妮,硕士研究生。E-mail: yanixxpay@163.com.

通讯联系人:方 群,博士,教授。E-mail: fangqun@zju.edu.cn.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(项目编号:20775071, 20575059)和科技部“973”项目(项目编号:2007CB714503, 2007CB914103)资助课题。

此可以看出采用玻璃芯片进行毛细管区带电泳在分离速度和柱效上明显优于常规毛细管电泳系统。

2 微流控芯片毛细管电泳分离蛋白质的模式

目前,文献报道的芯片毛细管电泳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。

2.1 芯片毛细管区带电泳

毛细管区带电泳是芯片毛细管电泳分离蛋白质的一种最基本的分离模式。它基于不同的蛋白质分子在电场中的迁移速率不同而实现分离,是一种简单、快速的分离方法。采用区带电泳分离模式已成功分离了多种蛋白质样品。

Colyer 等^[8]采用毛细管电泳芯片,以区带电泳模式对人血清蛋白样品进行了分离,可分辨出 4 个蛋白质区带(即 IgG、转铁蛋白、 α -1-抗胰蛋白酶和白蛋白区带,分别用以模拟血清蛋白样品中的 γ 、 β 、 α 1 和白蛋白区带)。其中蛋白质的荧光标记在分离之后进行,由于荧光染料 TNS(2-toluidinonaphthalene-6-sulfonate)标记血清蛋白的灵敏度较低,所以没能实现实际人血清蛋白样品的 5 个区带分离。Xiao 等^[9]采用区带电泳模式,以 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH 2.15)作为工作缓冲液,在通道宽度为 30 μ m 的聚二甲基硅氧烷(PDMS)芯片中,于 35 s 内实现了细胞色素 C 和溶菌酶的快速分离。Dodge 等^[10]设计了集成 8 个微阀和 1 个微泵的 PDMS 芯片,通过微阀微泵实现了对液流的有效控制。他们首先采用区带电泳的分离模式分离牛血清白蛋白和肌红蛋白,然后通过阀的作用将分离后的蛋白质组分分别引入微混合器中酶解,最后对产物进行质谱分析。该工作显示芯片技术可用于质谱分析前复杂蛋白样品的预处理。庄贵生等^[11]在石英芯片上以 75 mmol/L 硼酸盐缓冲液(pH 10.3)作为芯片电泳缓冲体系,分离了免疫球蛋白、 α -1-抗胰蛋白酶、牛血清白蛋白和铁传递蛋白,并对经临床确诊的妊娠高血压症、风湿性心脏病、多发性骨髓瘤患者的尿液样品进行电泳分析,在 2 min 内得到了与美国 Helena 电泳系统一致的分析结果。

在芯片毛细管电泳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。

Wu 等^[12]采用多层 88% 水解聚丙烯醇(PVA)修饰 PDMS 芯片,以区带电泳模式有效分离了两种碱性蛋白质(溶菌酶和核糖核酸酶)以及两种典型的酸性蛋白质(牛血清白蛋白和 β -乳球蛋白)。该涂层在 pH 3 ~ 11 范围内均可抑制电渗流的产生和蛋白的吸附作用,并且效果稳定,连续运行 70 次后分离效果仍然很好。该研究组^[13,14]随后又采用自组装方法在 PDMS 芯片通道表面加工环氧修饰的聚合物涂层抑制蛋白质的吸附,成功地分离了溶菌酶和核糖核酸酶 A。

Chiem 等^[15]在运行缓冲液中加入了无机电解质 NaCl 和中性表面活性剂吐温 20 来抑制蛋白质的吸附,利用芯片毛细管区带电泳进行了单克隆抗体的分离分析。

2.2 芯片毛细管凝胶电泳

在蛋白质组学和蛋白质分离研究中,凝胶电泳是广泛使用的分离技术。它是以凝胶等聚合物作为分离介质,利用其网络结构并依据被测组分的分子体积不同而进行分离的一种分离模式。在芯片上采用凝胶电泳模式分离蛋白质,更有利于实现分离操作的高速度和高效率。Yao 等^[16]采用十二烷基磺酸钠(SDS)凝胶电泳分离模式,对比了芯片 SDS 毛细管凝胶电泳与常规毛细管凝胶电泳系统分离蛋白质的性能,结果表明前者的分离效率明显优于后者,分离时间也明显低于后者。

与常规毛细管凝胶电泳相同,芯片毛细管凝胶电泳常用的筛分介质也分为凝胶和非胶聚合物溶液两种。交联聚丙烯酰胺凝胶是广泛使用的一种凝胶筛分介质,Herr 等^[17]首次将传统的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离蛋白质的方法移植到芯片上,采用光聚合的方法在芯片通道内制备浓度为 6% 的交联聚丙烯酰胺凝胶作为筛分介质,在 30 s 的时间内对相对分子量(M_r) 在 6 500 ~ 39 000 之间的 5 种蛋白质进行分离,分离距离仅为 4 mm,分离效率达到理论塔板数 4.41×10^5 。该研究组^[18]后期又在微通道内制备了浓度为 22% 的交联聚丙烯酰胺膜用于蛋白质样品的预富集,有效富集了相对分子质量为 12 000 ~ 205 000 的蛋白质分子,并采用浓度为 8% 的交联聚丙烯酰胺凝胶作为筛分介质进行分离。

Agirregabiria 等^[19]在聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)芯片上使用 SU-8 光胶制作微通道,采用浓度为 12% 的聚丙烯酰胺凝胶作为筛分介质分离蛋白质。随后该研究组^[20]又在芯片上集成金属电极,采用相同的分离模式成功地分离了相对分子量分别为 20 000 和 97 000 的胰蛋白酶抑制剂和磷酸化

酶两种蛋白质。

然而,交联聚丙烯酰胺凝胶存在制备复杂、不易使用等问题。与其相比,线性聚丙烯酰胺(PLA)、聚乙烯醇(PEG)、聚氧化乙烯(PEO)等非胶筛分介质具有制备简单、使用方便、可以先聚合后注入通道而无需在通道内进行聚合反应等优点,适合在复杂的通道体系中使用,因此在芯片毛细管凝胶电泳中非胶筛分介质得到了广泛的应用。Yao 等^[16]采用 SDS 14-200 凝胶缓冲液(Beckman Coulter 公司产品)在玻璃芯片上于 35 s 内分离了相对分子质量在 9 000 ~ 116 000 之间的 6 种蛋白质。Giordano 等^[21]将 NanoOrange 染料加入样品和缓冲液中进行蛋白质的动态标记,并对分离缓冲液体系进行了优化,最终选择 5% 的 PEO($M_r = 100\ 000$)作为筛分介质。该系统对牛血清白蛋白的检出限为 500 ng/mL,并完成了对实际人血清样品的分离分析。

在芯片毛细管凝胶电泳中,通道内壁对蛋白质的吸附仍是需要解决的重要问题。Bousse 等^[22]使用聚二甲基丙烯酸酯(PDMA)物理涂覆玻璃芯片微通道内壁,将电渗流降低到 $0.5 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$,以 SDS 凝胶电泳的分离模式在 40 s 内分离了 Bio-Rad 公司的蛋白质标准样品,分离效率达到 10^7 塔板/m。Nagata 等^[23]在 PMMA 芯片中使用了 PEG 涂层,以 5% 线性聚丙烯酰胺为筛分介质,在分离长度为 3 mm 的通道内实现了胰蛋白酶抑制剂、牛血清白蛋白和 β -半乳糖苷酶 3 种蛋白质的高速分离,分离时间仅为 8 s。

2.3 芯片等电聚焦分离

芯片等电聚焦分离蛋白质的原理与常规毛细管等电聚焦基本相同,都是依据蛋白质的等电点(pI)不同而进行分离。Hofmann 等^[24]首次将毛细管等电聚焦技术移植于玻璃芯片,应用于蛋白质分析。Li 等^[25]在 PDMS 芯片和聚碳酸酯(PC)芯片上,采用等电聚焦模式分离了牛血清白蛋白和增强型绿色荧光蛋白(EGFP)。Das 等^[26]采用高聚物芯片,在等电聚焦电泳模式下优化了分离长度及电压条件,最终在长 1.9 cm 的通道内于 1.5 min 内分离了绿荧光蛋白和 R 藻红蛋白,分离电压为 500 V。Cui 等^[27]在 PDMS 芯片上采用等电聚焦分离模式成功分离了重组绿荧光蛋白、异藻青蛋白和藻红蛋白。该作者还报道,通过改变样品和分离介质中添加剂甲基纤维素的浓度,可以改变完成蛋白质分离所需要的通道距离。

Tsai 等^[28]通过采用六甲基二硅氧烷等离子聚合膜修饰玻璃芯片通道的方法抑制蛋白质吸附,在等电聚焦的分离模式下分离了藻青蛋白($pI =$

4.65)、血红蛋白($pI = 7.0$)和细胞色素 C($pI = 9.6$)3 种蛋白质混合物,分离在 3 min 内完成,分离效率为 19 600 塔板/m。Huang 等^[29]在进行芯片等电聚焦分离蛋白质时,采用在两性电解质溶液中加入羟甲基纤维素作为添加剂的方法来抑制蛋白质的吸附。

2.4 芯片胶束电动毛细管电泳

胶束电动毛细管电泳是毛细管电泳与胶束增溶色谱相结合的分选技术,其原理是在装有胶束溶液的通道内,溶质组分在电场力的作用下根据其在胶束相和水相之间的分配不同而产生分离。Jin 等^[30]在玻璃芯片上采用胶束电动色谱的分选模式,以 Bio-Rad 公司的 CE-SDS 缓冲液作为分离介质,成功实现了相对分子质量在 14 400 ~ 200 000 之间的 8 种蛋白质的分离。Dou 等^[31]采用 Brij35 (polyoxyethylene[23] dodecanol)修饰 PDMS 芯片通道,在胶束电动色谱的分选模式下实现了葡萄糖氧化酶和肌红蛋白的有效分离。该芯片涂层在 pH 2 ~ 6 范围内可显著降低蛋白质大分子的吸附,并减少检测蛋白质所需的冲洗时间,从而提高分离效率。Huang 等^[32]在 PDMS 芯片中采用 0.1% 十二烷基麦芽糖(DDM)和 0.03% SDS 作为混合胶束,对通道进行动态修饰,有效地抑制了蛋白质的吸附,控制了电渗流,使蛋白质在非变性条件下得到有效分离。

2.5 芯片二维电泳分离

芯片毛细管电泳应用的成功促进了高速高效的芯片二维电泳技术的发展。对于多组分的复杂蛋白质样品,采用传统的一维分离方法通常无法满足要求,需要采用二维分离技术来提高分离效率,增加峰容量。与传统的毛细管电泳系统相比,在芯片上进行二维电泳分离,可以通过设计芯片通道结构实现通道的直接交叉或连通,而无需制作复杂的二维毛细管电泳接口,从而避免了因在接口处存在死体积而导致的谱带扩展现象。

在芯片二维电泳分离蛋白质的研究中,第一维分离模式多采用等电聚焦模式。Chen 等^[33]制作了二维毛细管电泳 PDMS 芯片,利用第一维的等电聚焦和第二维的凝胶电泳对荧光标记的牛血清白蛋白和碳酸酐酶以及德科萨斯红标记的卵清蛋白进行分离分析。Li 等^[34]设计了等电聚焦和凝胶电泳联用的二维分离高聚物芯片。蛋白质样品在完成第一维的等电聚焦分离后,可在多个并行的通道内完成第二维的凝胶电泳分离。整个分离过程在 10 min 内完成,峰容量达到 1 700。Herr 等^[35]研制了采用十字通道构型的等电聚焦-自由区带电泳二维芯片系

统,芯片通道宽 200 μm ,深 20 μm ,待测样品在横向通道中进行等电聚焦分离,分离后的样品区带在电场驱动下进入纵向区带电泳通道中进行二维分离。系统采用荧光显微镜成像的方法对分离性能进行了评价,5 min 内分离的峰容量达到 1 300。Wang 等^[36]通过在 PDMS 芯片中制作微阀来防止一维等电聚焦和二维凝胶电泳系统之间的分离缓冲液相混合,在 20 min 内有效分离了 4 种标准蛋白质。也有报道在 PMMA 芯片上进行 SDS 凝胶电泳和胶束电动毛细管电泳相结合的蛋白质二维电泳分离^[37]。该系统在 12 min 内完成 10 种蛋白质的分离,峰容量约为 1 000。

此外,还有一类基于芯片的二维分离系统主要应用于蛋白质酶解物的分离分析。通常第一维分离采用胶束电动毛细管电泳或毛细管电色谱模式,第二维分离采用区带电泳模式。2000 年,Ramsey 课题组^[38]首次在玻璃芯片上建立了胶束电动毛细管电泳(第一维)与区带电泳(第二维)结合的二维分离系统,并应用于细胞色素 C、核糖核酸酶、 α -乳白蛋白等的胰蛋白酶降解产物分离。其后,该课题组对系统进行了改进,加长了第一维电泳通道的长度,并采用细径转角通道来降低扩散,在约 15 min 内分离了牛血清白蛋白酶解物,峰容量达到 4 200^[39]。2001 年,他们还研制了开管电色谱和区带电泳相结合的芯片二维电泳系统,其电色谱分离部分采用长 25 cm 的具有十八烷基三甲氧基硅烷涂层的环状通道,区带电泳部分则采用长 1.2 cm 的直形通道,在 13 min 内实现了 β -酪蛋白胰蛋白酶解产物的分离^[40]。

相对于一维分离芯片,二维芯片分离系统具有很高的分离效率和峰容量,预计会在复杂蛋白质样品的分离上发挥更大的作用。

2.6 芯片自由流电泳

除上述分离模式外,芯片自由流电泳也是芯片电泳分离蛋白质的重要方法。芯片自由流电泳是指在芯片中通过外加电场使样品随缓冲液连续流动的同时沿电场方向进行电迁移,从而按照电泳淌度不同实现分离的电泳分离模式。Raymond 等^[41]采用芯片自由流电泳模式分离了人血清蛋白、缓激肽和核糖核酸酶 A,其分离长度为 3.1 cm,流出时间为 62 s。Kobayashi 等^[42]采用自由流电泳的分离模式在一个体积为 56.5 mm \times 35 mm \times 30 μm 的微分离室(60 μL)中实现了持续的蛋白质分离,并用羟丙基甲基纤维素涂覆来抑制蛋白质吸附,在 25 min 内有效分离了细胞色素 C 和肌红蛋白。最近,Kohlheyer 等^[43]制作了一种自由流等电聚焦分离蛋白质

的玻璃芯片,成功地将人血清白蛋白($pI = 4.4$)与等电聚焦标记物($pH 3$ 和 9)分离。

3 展望

微流控芯片毛细管电泳系统应用于蛋白质的分离分析具有突出的优越性,特别是在临床检验及现场监测等方面的应用具有良好的发展前景,同时,其对分析仪器的集成化、微型化与便携化的发展也具有重要意义。据文献报道,Renzi 等^[44]已经研制出手持式的微流控芯片电泳分离蛋白质装置。该装置由电泳芯片、小型激光诱导荧光检测系统以及高压电源等组成,其体积仅为 11.5 cm \times 11.5 cm \times 19.0 cm,可用于现场分析、床旁医学诊断以及取证分析。近年来,国内已有关于利用芯片毛细管电泳进行临床尿蛋白^[11,45]和脂蛋白^[46]检测的报道。最近,Pandey 等^[47]使用 Caliper 公司和 Agilent 公司的 P200 蛋白质芯片来检测微量的白蛋白尿,将蛋白质的电泳分离和荧光检测集成化、自动化,实现了其在临床实验室的应用。

目前,很多科研工作者正致力于微流控芯片毛细管电泳与质谱联用技术的研究,以进一步提高系统对复杂样品的分离分析能力。上述系统在蛋白质分离分析及蛋白质组研究中有广阔的应用前景。尤其是对于复杂蛋白质样品的多维分离分析,芯片毛细管电泳以其快速高效的特点,可以作为其中的一维分离方法,显著提高蛋白质的分析通量。相信随着研究的不断深入及相关技术的不断发展,微流控芯片毛细管电泳蛋白质分离技术将日趋成熟,在生化分析、临床诊断和蛋白质组研究领域发挥重要的作用。

参考文献:

- [1] Manz A, Graber N, Widemer H M. *Sens Actuators B*, 1990, B1(1): 244
- [2] Manz A, Harrison D J, Verpoorte E M J, et al. *J Chromatogr A*, 1992, 593(1/2): 253
- [3] Vilkner T, Janasek D, Manz A. *Anal Chem*, 2004, 76(12): 3 373
- [4] Reyes D R, Iossifidis D, Auroux P A, et al. *Anal Chem*, 2002, 74(12): 2 623
- [5] Dolnik V, Liu S R, Jovanovich S. *Electrophoresis*, 2000, 21(1): 41
- [6] Belder D, Ludwig M. *Electrophoresis*, 2003, 24(15): 2 422
- [7] Rodriguez I, Zhang Y, Lee H K, et al. *J Chromatogr A*, 1997, 781(1/2): 287
- [8] Colyer C L, Mangru S D, Harrison D J. *J Chromatogr A*, 1997, 781(1/2): 271
- [9] Xiao D Q, Le T V, Wirth M J. *Anal Chem*, 2004, 76(7): 2 055
- [10] Dodge A, Brunet E, Chen S, et al. *Analyst*, 2006, 131

- (10): 1 122
- [11] Zhuang G S , Liu J , Jia C P , et al. *Acta Chimica Sinica* (庄贵生 , 刘菁 , 贾春平 , 等. 化学学报) , 2006 , 64(3) : 229
- [12] Wu D P , Luo Y , Zhou X M , et al. *Electrophoresis* , 2005 , 26(1) : 211
- [13] Wu D P , Zhao B X , Dai Z P , et al. *Lab Chip* , 2006 , 6(7) : 942
- [14] Wu D P , Qin J H , Lin B C. *Lab Chip* , 2007 , 7(11) : 1 490
- [15] Chiem N , Harrison D J. *Anal Chem* , 1997 , 69(3) : 373
- [16] Yao S , Anex D S , Caldwell W B , et al. *Proc Natl Acad Sci USA* , 1999 , 96(10) : 5 372
- [17] Herr A E , Singh A K. *Anal Chem* , 2004 , 76(16) : 4 727
- [18] Hatch A V , Herr A E , Throckmorton D J , et al. *Anal Chem* , 2006 , 78(14) : 4 976
- [19] Agirregabiria M , Blanco F , Berganzo J , et al. *Electrophoresis* , 2006 , 27(18) : 3 627
- [20] Arroyo M T , Fernández L J , Agirregabiria M , et al. *J Micromech Microeng* , 2007 , 17(7) : 1 289
- [21] Giordano B C , Jin L J , Couch A J , et al. *Anal Chem* , 2004 , 76(16) : 4 705
- [22] Bousse L , Mouradian S , Minalla A , et al. *Anal Chem* , 2001 , 73(6) : 1 207
- [23] Nagata H , Tabuchi M , Hirano K , et al. *Electrophoresis* , 2005 , 26(14) : 2 687
- [24] Hofmann O , Che D P , Cruickshank K A , et al. *Anal Chem* , 1999 , 71(3) : 678
- [25] Li Y , de Voe D L , Lee C S. *Electrophoresis* , 2003 , 24(1/ 2) : 193
- [26] Das C , Fan Z F. *Electrophoresis* , 2006 , 27(18) : 3 619
- [27] Cui H C , Horiuchi K , Dutta P , et al. *Anal Chem* , 2005 , 77(5) : 1 303
- [28] Tsai S W , Loughran M , Hiratsuka A , et al. *Analyst* , 2003 , 128(3) : 237
- [29] Huang X Y , Ren J C. *Electrophoresis* , 2005 , 26(19) : 3 595
- [30] Jin L J , Giordano B C , Landers J P. *Anal Chem* , 2001 , 73(20) : 4 994
- [31] Dou Y H , Bao N , Xu J J , et al. *Electrophoresis* , 2004 , 25(17) : 3 024
- [32] Huang B , Kim S , Wu H K , et al. *Anal Chem* , 2007 , 79(23) : 9 145
- [33] Chen X X , Wu H K , Mao C D , et al. *Anal Chem* , 2002 , 74(8) : 1 772
- [34] Li Y , Buch J S , Rosenberger F , et al. *Anal Chem* , 2004 , 76(3) : 742
- [35] Herr A E , Molho J I , Drouvalakis K A , et al. *Anal Chem* , 2003 , 75(5) : 1 180
- [36] Wang Y C , Chio M H , Han J. *Anal Chem* , 2004 , 76(15) : 4 426
- [37] Shadpour H , Soper S A. *Anal Chem* , 2006 , 78(11) : 3 519
- [38] Rocklin R D , Ramsey R S , Ramsey J M. *Anal Chem* , 2000 , 72(21) : 5 244
- [39] Ramsey J D , Jacobson S C , Culbertson C T , et al. *Anal Chem* , 2003 , 75(15) : 3 758
- [40] Gottschlich N , Jacobson S C , Culbertson C T , et al. *Anal Chem* , 2001 , 73(11) : 2 669
- [41] Raymond D E , Manz A , Widmer H M. *Anal Chem* , 1996 , 68(15) : 2 515
- [42] Kobayashi H , Shimamura K , Akaida T , et al. *J Chromatogr A* , 2003 , 990(1/2) : 169
- [43] Kohlheyer D , Eijkel J C T , Schlautmann S , et al. *Anal Chem* , 2007 , 79(21) : 8 190
- [44] Renzi R F , Stamps J , Horn B A , et al. *Anal Chem* , 2005 , 77(2) : 435
- [45] Wang H M , Sun C L , Wang Y G , et al. *Chinese Journal of Laboratory Medicine* (王惠民 , 孙承龙 , 王跃国 , 等. 中华检验医学杂志) , 2004 , 27(9) : 551
- [46] Wang H M , Cong H , Sun C L , et al. *Acta Chimica Sinica* (王惠民 , 丛辉 , 孙承龙 , 等. 化学学报) , 2006 , 64(7) : 705
- [47] Pandey S , Lu C M , Herold D A. *Am J Clin Pathol* , 2008 , 129(3) : 432