

• 研究论文 •

一种可逆键合电泳微芯片的制作及在蛋白质分离中的应用

庄贵生^a 刘 菁^a 贾春平^a 金庆辉^a 赵建龙^{*,a,b} 王惠民^c

(^a 中国科学院上海微系统与信息技术研究所 上海 200050)

(^b 生物芯片上海国家工程研究中心 上海 201203)

(^c 南通大学附属医院 南通 226001)

摘要 阐述了一种可逆键合电泳微芯片的制作方法, 以及电泳微芯片在蛋白质分离、临床尿蛋白检测方面的应用. 用标准光刻腐蚀技术在石英基片上腐蚀泳道, 清洗腐蚀好的基片和盖片后, 在真空条件下实现键合. 此种方法键合制作的电泳微芯片可重复键合使用, 制得的电泳微芯片成功地用于标准蛋白质分离以及临床尿蛋白分析.

关键词 可逆键合; 电泳微芯片; 尿蛋白

Manufacture of Reversible Electrophoresis Chip and Its Application to Protein Detection

ZHUANG, Gui-Sheng^a LIU, Jing^a JIA, Chun-Ping^a
JIN, Qing-Hui^a ZHAO, Jian-Long^{*,a,b} WANG, Hui-Min^c

(^a Shanghai Institute of Microsystem and Information Technology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200050)

(^b National Engineering Center for Biochip at Shanghai, Shanghai 201203)

(^c Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001)

Abstract This paper described a low-cost and reliable process for reversible bonding fabrication of electrophoresis microchips on quartz glass substrates in ordinary laboratory without the requirement of clean room facilities, and the microchips have been used in model protein separation and clinical urinary protein detection. Patterns of microchannel were fabricated through standard photolithography and etching on the quartz glass substrate. After bonding surfaces were rigorously rinsed, bonding was realized in vacuum ovens. The chip could be separated and re-bonded for usage. The microchip in these studies was designed to realize on-chip separation of urinary proteins with UV detection. The electrophoretic buffer was 75 mmol/L borate with 0.5 mol/L lactate and pH 10.5. The chips have been used successfully for separation of model proteins and clinical urinary proteins.

Keywords reversible bonding; electrophoresis microchip; urinary protein

基于MEMS (microelectromechanical systems)技术制作的毛细管电泳微芯片为生物化学样品的分离分析提供了一种新的检测平台. 毛细管电泳微芯片具有常规毛细管电泳无法比拟的优势, 如良好的散热性, 可以外加比常规毛细管电泳更高的电场, 驱动样品快速进样和分

离, 分析时间短, 试剂消耗量少等. 近年来芯片毛细管电泳^[1~4]、芯片毛细管电色谱^[5]等已广泛用于 DNA^[6]、多肽^[7]、蛋白质^[8]的分离.

制作电泳微芯片的材料有很多, 如硅、玻璃、石英等. 近年来聚合物如 PDMS, PMMA 等材料由于加工简

* E-mail: jlzhao@mail.sim.ac.cn

Received July 14, 2004; revised January 20, 2005; accepted February 21, 2005.

国家 863 (No. 2002AA2Z2021)资助项目.

单、成本低,在毛细管电泳微芯片研究中得到了广泛的应用,但聚合物电泳微芯片多用于 DNA 核酸小分子^[9]、金属离子^[10]等的研究,较少用于蛋白质等大分子的分离.虽然 Xiao 等^[11]成功地对 PDMS 芯片内壁进行涂层处理,实现了标准蛋白质样品的分离,但存在的问题依然很多,主要问题在于聚合物材料内壁涂层困难,涂层的稳定性也有待研究,且聚合物材料表面对蛋白质的吸附严重等.玻璃和石英材料,由于其良好的光学、导热、绝缘以及电渗等性能,成为制作毛细管电泳微芯片的理想材料,在芯片电泳分离蛋白质的研究以及商业化芯片电泳分析系统,如安捷伦 2100、岛津公司的 MCE-2010 系列微芯片电泳分析仪等,所使用材料均是玻璃和石英.而石英可以通过 200 nm 波段左右的远紫外光,因此本文中选用石英作为芯片的制作材料,可通过 210 nm 波长紫外光,以满足紫外吸收光度法检测蛋白质的要求.

石英微芯片键合工艺已得到了广泛的研究,但研究一种简单、加工耗时短的芯片键合法仍然是需要的.近年来报道的芯片键合方法很多,如热键合、粘合等,低温键合方法也得到了广泛研究. Huang 等^[12]利用紫外胶粘合的方法实现玻璃电泳微芯片的键合,但该方法操作繁琐,前紫外胶易堵塞泳道. Wang 等^[13]利用硅酸钠做粘合层,实现 100 °C 下的低温键合,但这种键合方式需要在十分洁净的环境中进行. Nakanishi 等^[14]利用 HF 酸,室温下实现了玻璃键合,但满足键合需要比较严格的 HF 酸浓度和压力,且 HF 酸对玻璃具有强烈的腐蚀作用,渗透性强.本文叙述了一种简单快速、适用于普通实验室的石英芯片键合方法,可在真空条件下实现石英芯片的低温键合,此种方法键合的电泳微芯片可重复键合使用,减少了因芯片堵塞等现象而导致芯片无法使用.用该方法制得的芯片成功地用于标准蛋白质的分离以及临床尿蛋白样本的分析,这是首次将电泳微芯片应用于临床尿蛋白的检测分析.

1 实验部分

1.1 电泳微芯片制作

1.1.1 电泳微芯片制作材料

图形掩模板以及基片、盖片材料由上海杜邦掩膜有限责任公司提供.基片已经镀好铬.铬腐蚀液(硝酸铈铵 400 g+高氯酸 110 mL,去离子水定容至 1.76 L),石英玻璃腐蚀液(体积比 HF:H₂O₂:HAC=2:1:1),18 MΩ/cm 的超纯水.

1.1.2 电泳微芯片制作

通过标准光刻显影技术将掩模图形转移到基片表

面后,用铬腐蚀液去图形部分铬层;然后放入 40 °C 恒温的石英玻璃腐蚀液中腐蚀 45 min,得到电泳微通道;金刚钻在基片相应位置上钻孔径为 2 mmol/L 的孔,作为储液池.

1.1.3 键合

芯片键合表面的平整度、清洁度及亲和程度直接决定了键合的成功率高低,因而对基片、盖片表面进行严格清洗,且要增加表面的亲和力.具体操作过程如下:

表面去铬.芯片微管道腐蚀完毕后,用去离子水清洗,然后将基片放入配好的铬腐蚀液中,在超声池中 3 min 去铬层;

丙酮乙醇超声清洗.去离子水清洗后,分别用丙酮、乙醇超声清洗基片、盖片 5 min;

Piranha 洗液清洗.将基片、盖片放入 Piranha 洗液(体积比 H₂SO₄:H₂O₂=4:1),烧煮 10~15 min;

增加表面亲和力.从 Piranha 洗液中取出片子后,用去离子水冲洗干净,然后放入亲和洗液(体积比 NH₃·H₂O:H₂O:H₂O₂=6:3:1)中烧煮 30 min;

水中贴合芯片键合.用去离子水清洗 10 min 后,直接将基片和盖片在去离子水中贴合,然后转移到真空干燥箱(DZF6050,上海精宏实验设备有限公司)中.设定真空干燥箱温度为 100 °C,打开真空泵(2×Z-4 型,上海真空泵厂),持续抽真空 30 min 后关闭真空泵,保持 2 h 后设定干燥箱温度为 200 °C,保持 1 h 后关闭电源自然冷却,实现低温键合制得电泳微芯片.

1.2 蛋白质分离实验

1.2.1 试剂

标准蛋白:免疫球蛋白(IgG)、牛血清白蛋白(BSA)、铁传递蛋白(transferrin)购自美国 Sigma 公司,临床病人尿样由南通医学院附属医院提供,尿样经过透析、预浓缩处理,电泳缓冲体系是 pH=10.5, 75 mmol/L 的硼酸缓冲液.

1.2.2 分析仪器及检测原理

自制的电泳微芯片紫外检测分析仪.主要由光路系统,滤波电路系统和计算机控制及数据处理系统等构成.仪器采用紫外吸收光度法对蛋白质进行分离检测,通过检测样品在经过检测窗口后的吸光度变化实现对样品的检测.由 PMT(HC120-5,日本滨松株式会社)采集光信号、并转化成电信号,电信号由滤波电路及自行编制的软件处理,以提高信噪比,放大有效信号.进样分离电压由 1 和 3 kV 的高压电源(天津东文高压电源厂)提供,电压的控制由自行设计的控制电路完成.检测系统所用光源为氙灯,蛋白质在 210 nm 左右有一个特异的吸收,通过检测样品区带在这一波长下的吸光度变化

进行检测.

$$A = abc \quad (1)$$

A 为吸光度, a 为不同样品组分的吸光系数, b 为光程, c 为样品浓度. 在光程一定的情况下, 吸光度的大小与样品的浓度成正比且与样品的种类有关系.

1.2.3 操作过程

电泳进样分离模式如图 1 所示. 进样时, sample 池加 +500 V, 进样 15 s, sample 废液池接地, buffer 池和 buffer 废液池悬空; 分离时, buffer 池加 +2000 V, buffer 废液池接地, sample 池和 sample 废液池悬空. 检测窗口设在芯片分离管道距缓冲废液池弯道 5 mm 处.

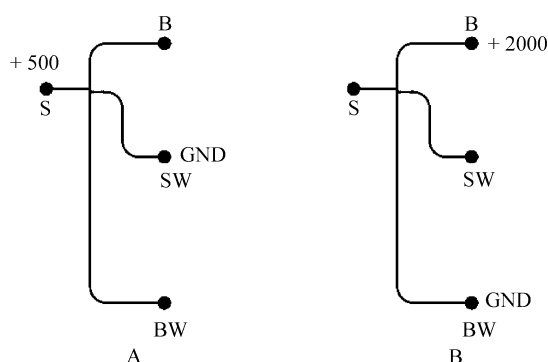


图 1 芯片电泳操作模式(A 图为进样模式, B 图为分离模式)

Figure 1 Operation mode of on-chip electrophoresis: A injection, B separation

S: sample reservoir; B: buffer reservoir; SW: sample waste reservoir; BW: buffer waste reservoir

1.3 芯片微管道内壁处理

芯片初次使用时, 用超纯水冲洗微管道, 1 mol/L 的 NaOH 溶液浸泡微管道 30 min, 然后用水和缓冲液冲洗 10 min. 在每次开始实验前, 先用缓冲液进行预电泳, 以平衡管道中离子浓度. 芯片在每两次使用期间, 依次用水、10% SDS、水和缓冲液冲洗微管道, 以得到良好的重现性.

2 实验结果和讨论

实验所得数据用 Microsoft Excel 和 Origin 6.0 进行处理, 转换为吸光度 A 与迁移时间 t_m 的关系.

2.1 单一标准蛋白检测

牛血清白蛋白 BSA (浓度为 5 mg/mL) 和铁传递蛋白 (浓度为 5 mg/mL), 分别用上述电泳操作过程进行分离检测, 得到分离图谱如图 2、图 3 所示. 电泳条件为: pH=10.5, 75 mmol/L 硼酸缓冲体系作为电泳分离介质; 进样平均电场为 200 V/cm, 进样时间 15 s, 平均分离电

场 330 V/cm; 检测波长 210 nm. 从图中可以看到分离检测的结果能够很好地重复出来.

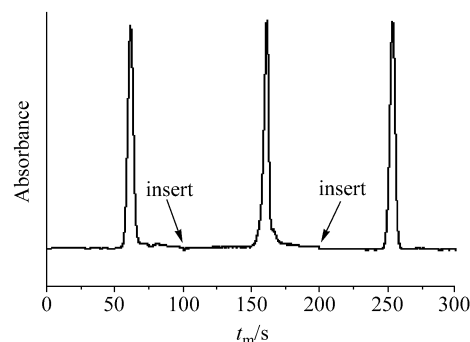


图 2 5 mg/mL 铁传递蛋白分离重现性图谱

此种可逆键合方法制得芯片多次使用后, 在相同条件下连续三次独立实验得到

Figure 2 Reproducibility of the separation of transferrin

Sample concentration: 5 mg/mL, electrophoretic buffer: 75 mmol/L NaB₄O₇ (pH=10.5), a 15 s injection was followed by 100 s separation time for each analysis. Separation lengths: 4 cm. The result from three experiments under the same condition after the chip was used for a long time.

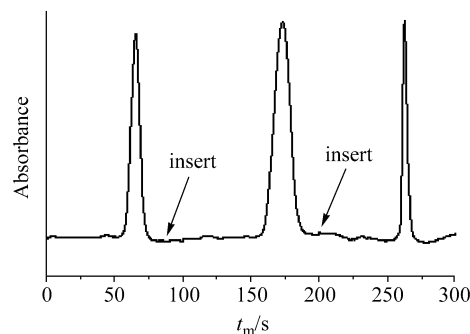


图 3 5 mg/mL 牛血清白蛋白分离重现性图谱

芯片多次重复键合后, 在相同条件下连续三次独立实验得到

Figure 3 Reproducibility of the separation of BSA

Sample concentration: 5 mg/mL, electrophoretic buffer: 75 mmol/L NaB₄O₇ (pH=10.5), a 15 s injection was followed by 100 s separation time for each analysis. Separation lengths: 4 cm. The result from three experiments under the same condition after the chip was repeated to bond time after time.

铁传递蛋白的分子量为 80 kD, 是一种糖蛋白, 属于 β 1 微球蛋白, 等电点(pI)为 5.6~6.6. 图 2 为铁传递蛋白重现性实验电泳图谱, 由图可以看出检测系统在 60 s 左右得到了转铁蛋白电泳特征峰, 芯片经过长久使用, 每次实验前用所述芯片微管道处理方法清洗后, 实验依然得到相似结果, 重现性良好. 图 2 表示铁传递蛋白在 pH=10.5 的硼酸缓冲体系中三次连续分析结果. 铁传递蛋白出峰时间相对标准差 RSD 为 5.22%.

牛血清白蛋白, 分子量 66 kD, 等电点(pI)为 4, 由图 3 牛血清白蛋白电泳图谱可知, 检测系统在 70 s 左右记录得到了牛血清白蛋白电泳特征峰. 芯片经过多次的基片和盖片的分离再键合后, 对牛血清白蛋白进行电泳

分析, 重现性良好. 图 3 表示牛血清白蛋白在 $\text{pH}=10.5$ 的硼酸盐缓冲体系中三次连续分析结果. 牛血清白蛋白出峰时间的相对标准差 RSD 为 8.31%.

2.2 混合标准蛋白检测

将下述两标准蛋白混合样品分别用本法制得的. 电泳微芯片在自制的尿蛋白紫外吸收检测仪上进行分离检测, 得到电泳分离图谱如图 4 和图 5. 混合样品 1: 牛血清白蛋白 BSA (4 mg/mL) 和铁传递蛋白 transferrin (4 mg/mL) 混合物; 混合样品 2: 人免疫球蛋白 (4 mg/mL), 铁传递蛋白 (4 mg/mL) 和牛血清白蛋白 BSA (4 mg/mL) 混合物.

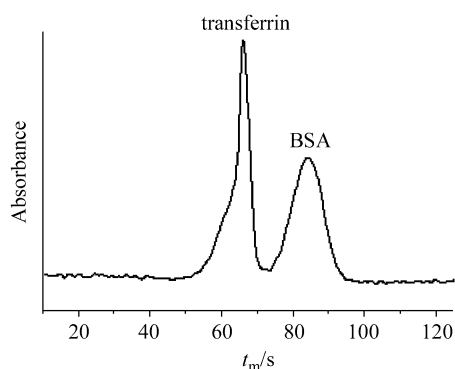


图4 铁传递蛋白和牛血清白蛋白混合样品电泳谱图

第一个峰为铁传递蛋白, 第二个峰为牛血清白蛋白

Figure 4 Electropherogram of the mixture of transferrin and BSA

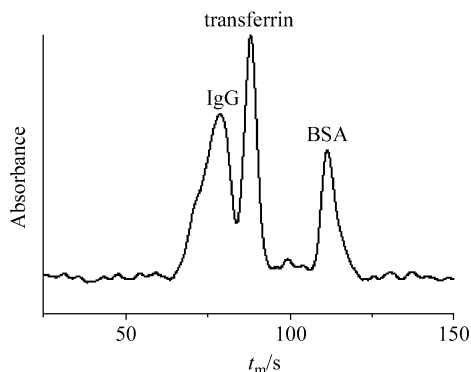


图5 铁传递蛋白和牛血清白蛋白混合样品电泳谱图

第一个峰为免疫球蛋白, 第二个峰为铁传递蛋白, 第三个峰为牛血清白蛋白

Figure 5 Electropherogram of the mixture of IgG, transferrin and BSA

图 4、图 5 分别 sA 是用本键合方法制得的芯片分离两种混合标准蛋白牛血清白蛋白、铁传递蛋白和三种混合蛋白免疫球蛋白、牛血清白蛋白、铁传递蛋白的电泳谱图.

免疫球蛋白、牛血清白蛋白、铁传递蛋白等电点(pI)分别是 8, 4.4, 5.6~6.6, 分子量分别是 160, 66, 80 kD.

蛋白质是两性电解质, 在 $\text{pH}=10.5$ 的硼酸盐缓冲液下, 三种标准蛋白带负电荷, 其电泳速度 v_{ef} 方向指向阳极. 样品进样采取电渗流驱动的进样方式, 电渗流速 v_{eo} 方向指向阴极. 不同蛋白质是依据其在分离泳道中荷质比不同而导致的迁移速度 v 不同实现蛋白质的分离检测.

$$v = v_{\text{ef}} + v_{\text{eo}} \quad (2)$$

由(2)式知, 蛋白质的迁移速度 v 是电泳速度 v_{ef} 和电渗流速 v_{eo} 之间的矢量和. 电渗流一致, 而带负电荷越多蛋白质的电泳速度越快, 受到的阻碍也越大, 因此迁移速度越低, 在电泳谱图上的位置越靠后. 由此可以根据出峰时间、出峰位置判断电泳谱图中各个峰所代表的蛋白质, 第一个峰的位置为免疫球蛋白, 第二个峰的位置为铁传递蛋白, 第三个峰的位置为牛血清白蛋白.

在整个实验过程中监测了分离电流, 电流保持稳定, 一般在 $10 \mu\text{A}$ 左右, 没有发生电流急剧增大现象, 这说明芯片在使用过程中未发生渗漏现象.

2.3 临床尿蛋白检测

用该方法键合的电泳微芯片对肾病综合症 (nephropathy syndrome, NS) 和妊娠高血压症 (Gestational Hypertension Syndrome, GHS) 病人的尿液进行分析, 并与在 Helena 公司的 REP 全自动电泳仪上进行的琼脂糖凝胶电泳 (SP 300 plate 琼脂糖凝胶电泳试剂盒) 结果作对照. 这两种病人典型的病理现象是尿液中白蛋白含量增高, 在电泳谱图中有一白蛋白特征峰. 所选病人尿液在进行检测前进行了透析浓缩等预处理, 且测定尿液处理后蛋白浓度, 分别为 4.17, 3.45 mg/mL.

图 6 是本法制得芯片用于分析临床病人尿液蛋白得到的电泳谱图以及琼脂糖平板凝胶电泳结果灰度扫描图. 由图可知, 芯片电泳结果在白蛋白的位置上, 都有一特征吸收峰, 这与琼脂糖平板凝胶电泳结果一致. 图中凝胶电泳灰度扫描图蛋白峰位置与芯片电泳结果正好相反, 这是因为凝胶电泳是依据电泳速度不同实现分离, 白蛋白的电泳速度最快, 因此峰形最靠前; 而芯片电泳是依据迁移速度[如公式(2)]不同实现分离, 白蛋白迁移速度最慢, 因此白蛋白的特征峰最后出现.

3 结论

本研究报道了一种基于石英材料的可逆键合电泳微芯片制作方法, 整个制作过程可在非净化的一般实验室完成, 且制得的芯片可重复键合使用. 用该方法制得的芯片对标准蛋白进行分析, 分离速度快, 分离峰清晰, 且电泳结果重现性良好. 初步将芯片应用于临床病人的尿蛋白分析检测方面的研究, 与 Helena 公司 REP 全自

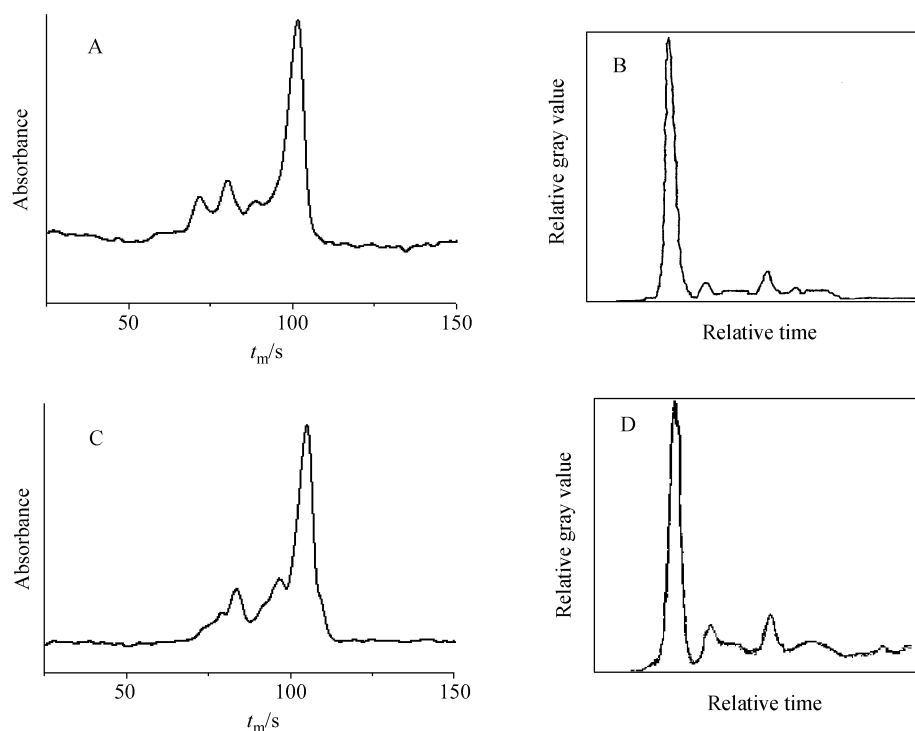


图6 尿蛋白电泳谱图以及平板凝胶电泳荧光扫描结果

(A) 肾病综合症尿蛋白电泳分离谱图, (B) 肾病综合症尿蛋白平板凝胶电泳灰度扫描结果, (C) 妊娠高血压症尿蛋白电泳分离谱图, (D) 妊娠高血压症尿蛋白平板凝胶电泳灰度扫描结果

Figure 6 Electropherogram of the separation of urinary proteins and gray scanning result of the photo of slab gel

(A) Electropherogram of urinary proteins of NS, (B) gray scanning result of NS, (C) electropherogram of GHS, (D) gray scanning result of GHS

动电泳仪上进行的琼脂糖凝胶电泳结果相符, 这也是首次将芯片电泳方法用于临床尿蛋白检测分析. 和常规方法相比, 电泳微芯片分离临床尿蛋白, 操作简单, 检测效率高、速度快、样品消耗少, 这些优点对于疾病的快速诊断有很大优势, 显示了电泳微芯片的广阔应用前景.

References

- 1 Fan, Z. H.; Harrison, D. J. *Anal. Chem.* **1994**, 66, 177.
- 2 Jacobson, S. C.; Hergenroder, R.; Koutny, K. B.; Ramsey, J. M. *Anal. Chem.* **1994**, 66, 1114.
- 3 Effenhauser, C. S.; Manz, A.; Widmer, H. M. *Anal. Chem.* **1995**, 67, 2284.
- 4 Fluri, K.; Fitzpatrick, G.; Chiem, N.; Harrison, D. J. *Anal. Chem.* **1996**, 68, 4285.
- 5 Jacobson, S. C.; Hergenroder, R.; Koutny, L. B.; Ramsey, J. M. *Anal. Chem.* **1994**, 66, 2369.
- 6 Woodey, A. T.; Mathies, R. A. *Anal. Chem.* **1995**, 67, 3676.
- 7 Hofman, O.; Che, D.; Cruickshank, K. A. *Anal. Chem.* **1999**, 71, 678.
- 8 Liu, Y. J.; Robert, S. F.; Christopher, T. C.; Stephen, C. J.; Roseitha, S. R.; Ramsey, J. M. *Microcolumn Separations* **2000**, 12, 407.
- 9 Lin, Y. C.; Ho, H. C.; Tseng, C. K.; Hou, S. Q. *J. Micro-mech. Microeng.* **2001**, 11, 189.
- 10 Liu, B. F.; Ozaki, M.; Utsumi, Y.; Hattori, T.; Terabe, S. *Anal. Chem.* **2003**, 75, 36.
- 11 Xiao, D. Q.; Le, T. V.; Wirth, M. J. *Anal. Chem.* **2004**, 76, 2055.
- 12 Huang, Z. L.; Sanders, J. C.; Dunsmor, C.; Ahmadzadeh, H.; Landers, J. P. *Electrophoresis* **2001**, 22, 3924.
- 13 Wang, H. Y.; Foote, R. S.; Jacobson, S. C.; Schneibel, J. H.; Ramsey, J. M. *Sens. Actuators, B* **1997**, 45, 199.
- 14 Nakanishi, H.; Nishimoto, T.; Nakamura, R.; Yotsumoto, A.; Yoshida, T.; Shoji, S. *Sens. Actuators, A* **2000**, 79, 237.

(A0407146 LU, Y. J.; DONG, H. Z.)