含有二氧化钛薄膜增强虚拟阀的微流控芯片 用于二维凝胶电泳分离

苏建加¹ 陈 宏^{* 2}

(厦门大学电化学技术教育部工程研究中心¹, 萨本栋微米纳米科学技术研究院², 厦门 361005)

摘 要 在微流控芯片上进行二维电泳,能够有效缩短分析时间、减少试剂和样品消耗,并实现高通量分析,但需要隔离两维间不同的缓冲液体系,并能实现对蛋白的有效控制和传输。本研究在虚拟阀的基础上,通过两相界面上的水解反应,在两维微通道的接口处沉积一层二氧化钛薄膜,以增强虚拟阀的效果。分别对等电聚焦和 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳过程进行了考察。等电聚焦耗时约5 min ,然后经电转移进入第二维通道进行凝胶电泳分离。凝胶电泳过程需 5~10 min ,迁移率与分离时间线性相关,与蛋白质分子量的对数值成反比。在上述工作的基础上,对蛋白质混合物进行了差异二维电泳分离。

关键词 微流控芯片; 二维电泳; 接口; 二氧化钛

1 引 言

二维凝胶电泳能在一块凝胶上分离并检测几千甚至上万种蛋白质 具有极高的分离分辨率和峰容 量 是生物实验室中广泛采用的一种分离方法^[1~5]。但它也存在着一些不足 如电泳过程产生的焦耳热 会引起凝胶的卷曲和蛋白质的热扩散、整个分离过程极为耗时费力等^[6,7]。微流控芯片能有效缩短分 析时间、减少试剂和样品消耗、进行高通量检测等^[8~11]在微流控芯片上进行二维电泳可以有效克服常 规电泳的不足[12~14]。已有报道将常规二维电泳转移到微流控芯片上进行[6,15,16],一般使用一根微通道 进行等电聚焦分离 与之交叉的多根平行微通道对第一维分离后的蛋白质进行凝胶电泳分离。在两维 通道之间需要制作微阀或者类似隔离结构,一方面,隔离等电聚焦和凝胶电泳所需的不同缓冲液体系; 另一方面 在等电聚焦过程中阻止蛋白质提前扩散进入第二维 在等电聚焦完成后又将蛋白质均一、无 残留地转移进入第二维。目前已有不同方法实现这一功能,如物理上的隔离^[17]、连接孔^[6]等,上述方法 需要人工介入 重新组装芯片或调整芯片结构 操作繁琐 无法快速自动完成。有文献报道 使用线性聚 合物[13]、虚拟阀[16]可降低缓冲液和蛋白质的扩散过程,或采用狭小通道[18]减少扩散总量,但是这些方 法还是无法完全避免扩散过程,具有一定程度的泄漏。本研究在虚拟阀的基础上,通过界面处的水解反 应在微通道连接处沉积一层二氧化钛薄膜来提高虚拟阀的性能。二氧化钛薄膜提供的额外流体阻力能 够进一步降低扩散作用,其存在的纳米尺度的孔洞在电转移过程中不会阻碍蛋白质的转移。本研究分 别在微通道内进行等电聚焦和 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳考察了其分离性能 ,最后对蛋白质混合物进行 了差异凝胶电泳分离。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

丙烯酰胺单体(丙烯酰胺/N,N-亚甲基双丙烯酰胺,19:1,浓度40%)、羟基丙基纤维素(HPC,分子量80000)、1-羟基环己基苯基甲酮(HCPK)、钛酸四异丙酯、牛血清白蛋白(BSA)、卵白蛋白、I型胰蛋白酶抑制剂、碳酸酐酶和血红素,均购自Sigma-Aldrich公司。两性电解质(pH3~10,Bio-Rad Labo-ratories公司)。丙三醇、乙酸、十二烷基硫酸钠(SDS)和Tris-HCl(pH=8.0,1 mol/L),购自Fisher Scien-tific公司。Rainbow分子量标准(RPN800E)、Cy2和Cy3标记试剂购自GE Healthcare公司。

²⁰¹⁵⁻⁰¹⁻⁰⁵ 收稿; 2015-03-26 接受

本文系国家自然科学基金(No. 21005066)和高等学校博士学科点专项科研基金(No. 20100121120025)资助项目

^{*} E-mail: hongc@ xmu. edu. cn

2.2 检测平台

蛋白质分别经 Cy2 和 Cy3 标记,使用自制的荧光检测装置进行检测。采用两台激光器(波长分别 为 488 和 532 nm,光束直径约 1 mm)作为激发光源,分别对 Cy2 和 Cy3 进行激发。发射出的两束激光 经二相色镜后调节到同一光路,扩束器将光束的直径扩大为原来 20 倍,并被投射到微流控芯片上。激 发出的荧光经带通滤光片由制冷 CCD 进行检测。检测是在分离开始后的某个时刻,对整个微流控芯片 上被激发出的荧光进行拍照,得到荧光信号的二维分布。

2.3 实验步骤

2.3.1 微流控芯片制备 微流控芯片如图 1 所示,有一锯齿形的微通道(AB)用于等电聚焦分离, 38 根平行的微通道(CD)用于凝胶电泳分离。首先在 CD 通道中制作聚丙稀酰胺凝胶,方法如文献 [16]所述。然后在通道 AB 和 CD 的连接处制作二氧化钛薄膜:钛酸四异丙酯在矿物油中配成 10% 的 溶液;将其引入到 AB 通道中,在微通道的连接处与通道 CD 内的水相缓冲液形成两相界面;钛酸四异丙 酯在界面处发生水解反应,生成的二氧化钛沉积在界面上;室温下温育 30 s,依次使用矿物油和缓冲液 清洗通道 AB,即制备得到用于增强虚拟阀的二氧化钛薄膜。

2.3.2 蛋白质的二维电泳 将等电聚焦缓冲液引入并充满通道 AB ,缓冲液包括 2% 两性电解质、8% 丙三醇、2.3% HPC 和荧光标记的蛋白质。10 mmol/L 乙酸和 10 mmol/L 乙醇胺分别作为阳极电解液和 阴极电解液 ,加入到 AB 通道两端的储液池中。在 AB 通道的两端施加 200 V 电压 ,进行等电聚焦。在 电场作用下,蛋白质沿 pH 梯度实现聚焦和分离 ,当等电聚焦的峰不再移动时 ,可以认为等电聚焦过程 已经完成。在 CD 通道的两端储液池添加电泳缓冲液(20 mmol/LTris-HCl 和 10% SDS),施加 1200 V 的电压进行凝胶电泳分离。聚焦后的蛋白质与 SDS 相作用形成复合物 ,复合物在电场作用下穿 过二氧化钛薄膜并进入平行的 CD 通道 ,在凝胶中由于分子量的不同而实现第二维的分离。

3 结果与讨论

3.1 二维接口的设计和加工

图1是所使用的微流控芯片,采用锯齿形的 AB 通道使聚焦后的蛋白质能更均一、重现地转移进入 第二维通道,CD 通道中聚合形成的凝胶能够起到"虚拟阀"的效果^[16]。为了进一步增强"虚拟阀"的效 果,在通道的连接处沉积一层二氧化钛薄膜,如图 1c 所示。钛酸四异丙酯极易水解,生成二氧化钛,其



图 1 用于蛋白质二维电泳分离的微流控芯片

Fig. 1 Microfluidic chip used for two dimensional electrophoresis of proteins

(a) 微流控芯片整体构型; (b) 锯齿形的等电聚焦通道与平行的凝胶电泳通道的连接; (c) 二氧化钛薄膜沉积在两维通 道之间的连接处; (d) 钛酸四异丙酯水解生成的二氧化钛及其电镜照片。

(a) The design of the microfluidic chip; (b) The interface between the serrated microchannels for isoelectric focusing electrophoresis (IFE) and parallel microchannels for SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE); (c) Titanium dioxide membrane was deposited at the interface of microchannels; (d) Titanium dioxide hydrolyzed from the titanium isopropoxide and its SEM image. 扫描电镜照片如图 1d。二氧化钛颗粒相连呈网状结构,其结构和外形在电泳前后没有明显变化,强度可保证实验顺利进行。其网络结构的孔径在 10⁻⁸~10⁻⁷ m 之间,能够为"虚拟阀"提供额外的支撑,并 进一步降低蛋白质在微通道之间的扩散。

二氧化钛薄膜的存在能够进一步降低蛋白质的扩散过程,如图2所示。图2a是标记后的蛋白质在 未加工有二氧化钛薄膜的微通道内的分布。蛋白质不仅充满了微通道 AB,还向平行微通道 CD内部扩 散,荧光信号强度随着与通道 AB 距离的增加而逐渐降低。在制作有二氧化钛薄膜的微通道内(图 2b),蛋白质主要分布在微通道 AB 内,与平行微通道 CD 之间能看到一个明显的界面(即荧光强度产生 突变的位置),说明蛋白质被二氧化钛薄膜阻挡在通道 AB 内。



图 2 荧光标记的蛋白质在(a) 未加工和(b) 有二氧化钛薄膜的微通道内的分布

(b) titanium dioxide membrane

3.2 芯片等电聚焦电泳和凝胶电泳

为了验证在制作有二氧化钛薄膜的微流控芯片上能否完成二维电泳分离,首先在其中单独进行等 电聚焦分离。将 Cy2 标记的4种蛋白质(卵白蛋白、胰蛋白酶抑制剂、牛血清白蛋白和血红素)混合在 等电聚焦缓冲液中进行分离。电泳约5 min 后,沿着通道 AB 得到如图3 所示的等电聚焦分离图谱,横 坐标是蛋白质的等电点所对应的 pH 值,纵坐标是荧光强度。这4种蛋白质的等电点(pI 值)分别为 4.54,4.50,4.70和6.80^[16],由图3可见,实验结果与文献报道结果相符。



图 3 4 种蛋白质混合物的等电聚焦分离谱图

Fig. 3 IEF result of four proteins mixture

在微流控芯片上单独对蛋白质进行凝胶电泳分离。将荧光标记的蛋白质溶液加入并充满 AB 通 道,CD 两个储液池也加入缓冲液并开始进行电泳。C 储液池中的 SDS 在电场作用下会通过微通道到 达 AB 通道并与其中的蛋白质形成 SDS-蛋白质复合物。带负电的复合物在电场作用下进入聚丙稀酰胺 凝胶并实现分离。Rainbow 分子量标准含有 10 种不同分子量的蛋白质,分别是 12,17,24,31,38, 52,76,102,150 和 225 kDa。实验所用的凝胶含有 10% 丙烯酰胺 不适用于较大分子量的蛋白质的分 离 这里只实现了 7 种较低分子量蛋白质的分离。蛋白质区带的迁移距离和分子量的对数值呈反比关 系(*R*² = 0.9733) 在微通道内进行凝胶电泳能够很好地实现蛋白质样品的分离。也单独对胰蛋白酶抑 制剂进行凝胶电泳分离,在不同的时刻得到胰蛋白酶抑制剂的迁移距离。迁移距离与分离时间呈线性

Fig. 2 Distribution of fluorescence labeled protein inside microchannels without (a) and with

关系(R²=0.9995),说明微通道内聚合的聚丙烯酰胺凝胶均一稳定,性能良好。

在 38 根 CD 平行通道中同时对 4 种蛋白质的混合物(牛血清白蛋白、卵白蛋白、胰蛋白酶抑制剂和 碳酸酐酶)进行了凝胶电泳分离,其分离过程的照片如图 4a 所示,红色实线箭头指示着迁移方向,绿色 虚线箭头指示第 8 条微通道中 4 种蛋白质的区带。除了少数几根通道迁移速度较慢外,蛋白质区带在 各根微通道内的迁移速率比较一致。蛋白质在各条微通道中的迁移距离和迁移速度可通过各自通道中 未反应的荧光标记物的前沿进行标定。迁移速度由快到慢的蛋白质依次为胰蛋白酶抑制剂、碳酸酐酶、 卵白蛋白和牛血清白蛋白,迁移距离和分子量的对数值呈线性关系(图4b)。



图 4 (a) 4 种蛋白质混合物在平行微通道内的分离照片; (b) 迁移距离和分子量之间的关系

Fig. 4 (a) Separation of four proteins in parallel microchannels and (b) relationship between migration distance and logarithm of molecular weight

3.3 芯片二维电泳

为了比较不同批次分离实验之间的差异 在微流控芯片上进行了差异凝胶电泳的分离。两种蛋白质(牛血清白蛋白和卵白蛋白)分别经 Cy2 和 Cy3 标记后进行混合。将蛋白质混合物与缓冲液混合后引入到微通道内依次进行等电聚焦和凝胶电泳。等电聚焦耗时约 5 min ,然后进行凝胶电泳分离。与SDS 形成的蛋白质复合物在电场作用下 ,穿过二氧化钛薄膜进行第二维的分离。凝胶电泳过程也大约耗时需要 5~10 min。图 5a 和图 5b 分别是 Cy2 和 Cy3 标记的蛋白质的检测结果 ,X 轴是平行微通道的序号(对应蛋白质的 pI 值), Y 轴是迁移距离(对应蛋白质的分子量) Z 轴是蛋白质斑点的荧光强度。



图 5 Cy2(a) 和 Cy3(b) 标记的蛋白质差异凝胶电泳分离图谱

Fig. 5 Differential gel electrophoresis of Cy2 labeled BSA and ovalbumin (a) and Cy3 labeled BSA and ovalbumin (b)

4 结 论

本研究在虚拟阀的基础上,在两维通道的连接处沉积一层二氧化钛薄膜,以隔离两维所需的不同缓 冲液,并进一步降低蛋白质的扩散作用。测试了蛋白质的等电聚焦和凝胶电泳分离,考察了微流控芯片 的分析性能,并尝试对蛋白质混合物进行了差异二维凝胶电泳分离。后续还将优化芯片布局、分离参数

等,以进一步提高二维电泳的分离性能。

References

- 1 Smith R D. Nat. Biotechnol. , 2000 , 18(10) : 1041 1042
- 2 Service R F. Science , 2001 , 294(5549) : 2074 2077
- 3 Wittmann-Liebold B , Graack H , Pohl T. Proteomics , 2006 , 6(17): 4688 4703
- 4 OFarrell P H. J. Biol. Chem. , 1975 , 250(10): 4007 4021
- 5 Sanders G H W , Manz A. Trends Anal. Chem. , 2000 , 19(6): 364 378
- 6 Chen X, Wu H, Mao C, Whitesides G M. Anal. Chem. , 2002, 74(8): 1772-1778
- 7 Hille J M , Freed A L , Watzig H. *Electrophoresis* , 2001 , 22(19) : 4035 4052
- 8 Reyes D R, Jossifidis D, Auroux P A, Manz A. Anal. Chem. , 2002, 74(12): 2623 2636
- 9 Auroux P A, Jossifidis D, Reyes D R, Manz A. Anal. Chem. , 2002, 74(12): 2637-2652
- Fang Zhao-Lun. *Microfluidic Chips*. Beijing: Science Press, 2003: 7
 方肇伦. 微流控分析芯片. 北京: 科学出版社, 2003: 7
- LIN Bing-Cheng. Micro/Nanofluidic Chip Laboratory. Beijing: Science Press, 2013: 153
 林炳承. 微纳流控芯片实验室. 北京: 科学出版社, 2008: 153
- 12 Ramsey J D , Jacobson S C , Culbertson C T , Ramsey J M. Anal. Chem. , 2003 , 75(15): 3758 3764
- 13 Herr A E, Molho J I, Drouvalakis K A, Mikkelsen J C, Utz P J, Santiago J G, Kenny T W. Anal. Chem. ,2003, 75(5): 1180-1187
- 14 Shadpour H , Soper S A. Anal. Chem. , 2006 , 78(11): 3519 3527
- 15 Li Y ,Buch J S , Rosenberger F , DeVoe D L , Lee C S. Anal. Chem. , 2004 , 76(3): 742 748
- 16 Das C , Zhang J , Denslow N D , Fan Z H. Lab Chip , 2007 , 7(12): 1806 1812
- 17 Tsai S W Loughran M , Karube I. J. Micromech. Microeng. , 2004 , 14(12): 1693 1699
- 18 Emrich C A, Medintz I L, Chu W K, Mathies R A. Anal. Chem. , 2007, 79(19): 7360-7366

A Microfluidic Chip with Titanium Dioxide Membrane Enhanced Pseudo Valve Used for the Two-Dimensional Electrophoresis

SU Jian-Jia¹ , CHEN Hong^{* 2}

(Engineering Research Center of Electrochemical Technology¹, Pen–Tung Sha Institute of Micro–Nano Science and Technology², Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract Two-dimensional electrophoresis performed on a microfluidic chip could reduce the consumption of sample and reagents , realizing high-throughput analysis in a very short time. During the isoelectric focusing (IEF) separation , the buffer for the two different separation methods should be kept from being mixed. After the IEF , the protein was transferred from the IEF channel into the second dimension channels. Based on the pseudo valve structure , this paper reported a method to deposit a titanium dioxide membrane at the interface of two dimensional channels , which enhanced the performance of the pseudo valve. The IEF electrophoresis and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) procedures were characterized respectively. The total separation took 10 - 15 min , and the protein's migration rate was linear with the migration time , and inversely proportional to the logarithm of protein molecular weight. Based on the above results , the differential two-dimensional electrophoresis was performed to test the deviation between different measurements.

Keywords Microfluidic chip; Two-dimensional electrophoresis; Interface; Titanium dioxide

(Received 5 January 2015; accepted 26 March 2015)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 21005066) and the Specialized Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education of China (No. 20100121120025)