

谨以此文庆贺张玉奎院士七十华诞

DOI: 10.3724/SP.J.1123.2011.00857

基于液滴微流控接口的高效液相色谱- 毛细管电泳二维分离平台初探

叶淋泉, 吴清实, 戴思敏, 肖志良, 张博*

(厦门大学化学化工学院, 福建 厦门 361005)

摘要:蛋白质组体系的高度复杂性需要更高分辨率的多维分离技术。近年兴起的液滴技术在微纳尺度样品操控方面具有微体积、低扩散、无返混等独特优势,有望为多维分离平台的接口提供解决方案。通过采用不同结构的液滴微流控芯片可以实现“液滴生成”与“油相排除”功能,进行样品由连续流-非连续流-连续流的高效转移,将不同的分离模式进行二维耦联。本研究利用液滴作为接口技术耦联高效液相色谱与毛细管电泳构建二维分离系统,以蛋白质降解的复杂多肽混合物为样品,考察了液滴接口二维分离平台的可行性和有效性,并获得3 000以上的峰容量,初步展示了该接口技术在多维分离分析领域的应用潜力。

关键词:液滴;微流控芯片;蛋白质组学;多维分离;接口

中图分类号:O658 文献标识码:A 文章编号:1000-8713(2011)09-0857-05

Development of a droplet-interfaced high performance liquid chromatography-capillary electrophoresis two dimensional separation platform

YE Linquan, WU Qingshi, DAI Simin, XIAO Zhiliang, ZHANG Bo*

(College of Chemistry & Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: Proteomics demands high resolution multidimensional separation techniques due to its extremely high complexity. Droplet microfluidics provides a series of unique advantages in manipulating micro and nanolitre samples, such as micro-volume operation, limited diffusion and none cross-contaminating, therefore has the potential to be an ideal interface strategy for multidimensional separation. Using the microchips of different structures, functions such as “droplet generation” and “oil depletion” can be realized. Based on these functions, samples can be transferred from continuous flow to segmented flow and then back to continuous flow. In this way, different separation modes can be combined. In this study, droplet technology was utilized as a novel interface strategy in combining high performance liquid chromatography (HPLC) and capillary electrophoresis (CE). Using tryptic peptides mixture as a sample, this two dimensional HPLC-CE system provided high resolution separation with a peak capacity over 3 000. This proof-of-principle study has demonstrated the usefulness of droplet interface technology in multidimensional separation.

Key words: droplet; microfluidic chips; proteomics; multidimensional separation; interface

蛋白质组学以细胞、组织、器官甚至整个生物体所表达的全部蛋白质为研究对象,其体系高度复杂。以人血浆为例,其中包含的蛋白质多达20 000种以上,低丰度与高丰度蛋白质的含量差异更是涵盖了10个以上的数量级^[1]。因此,蛋白质组学研究迫切需要高分辨的分离技术^[2]。传统的单维分离技术如

高效液相色谱(HPLC)、毛细管电泳(CE)等,由于只能提供有限的峰容量,无法满足蛋白质组研究的要求。多维分离技术通过耦合正交的分离模式能够显著地提高分辨率,更适合于复杂体系的分离分析,有效地推动了蛋白质组学的发展^[3-6]。二维凝胶电泳(2D-PAGE)以其高分辨率成为传统蛋白质组学研究

* 通讯联系人:张博,博士,副教授,研究方向为分离科学与蛋白质组学技术。E-mail: bozhang@xmu.edu.cn.

基金项目:国家自然科学基金项目(No. 21005065)和教育部高等学校博士点专项科研基金项目(No. 20100121120006)。

收稿日期:2011-07-27

方法中最为常用的分离手段^[7]。然而该方法存在着诸多缺陷,如:操作费时费力,通量低,可分离鉴定的蛋白质范围有限,且不能与质谱鉴定技术在线联用等,大大限制了其应用范围。近年来,基于 HPLC 和 CE 构建的多维 LC/CE 分离技术逐渐发展起来^[8-14]。HPLC 和 CE 具有高度仪器化和自动化的优点,较好地弥补了二维凝胶电泳的缺陷,在生物分子分离领域展现了其显著的优势和发展潜力。基于 HPLC 和 CE 耦合的多维分离技术关键在于其接口技术,样品在维与维之间传递过程中的分子扩散和返混现象会造成分辨率的损失,这是其峰容量往往无法超越二维凝胶电泳的一个原因。此外,很多在线的耦合模式为了支持二维分离的连续性,通常在第一维采用较低的分速度,而在第二维采用高速分离,这样就无法充分优化每一分离维度以实现二维分离效能的最大化。如果可以克服这些问题,多维液相色谱/毛细管电泳分离技术的峰容量还有很大的提升空间。

近年兴起的液滴微流控技术为多维分离接口提供了新的解决方案。液滴技术使用两种不混溶的流体:水相和油相,在其交界处形成非连续流,即液滴^[15]。液滴技术的优良特性包括:快速的反应/混合动力学、有限扩散和可编码调控的多反应单元等,并且在高通量分析方面显示了潜能^[16-18]。液滴具有微体积、低扩散、无返混的特点,使其能高保真地将分离的信息进行存储。利用液滴微流控可建立有效的接口技术^[19]:将第一维分离后的样品以液滴的形式进行分集和封存,最大限度地保留上一维的分辨率;接着,在分离的下一维将液滴以全进样的方式逐滴进样进行电泳分析。本文采用这一全新的接口技术,构建反相液相色谱-毛细管区带电泳(RPLC-CZE)二维分离平台,并通过复杂多肽混合物的分离分析对其在蛋白质组学研究中的应用进行初步探索。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); ActiPix D100 紫外检测器(英国 Paraytec 公司); CAPCELL PAK MG C18 色谱柱(2.0 mm×150 mm, 5 μm, 日本资生堂); Waters quanta 4000E 毛细管电泳仪(美国 Waters 公司); HARVARD 精密注射泵(PHD2000, 美国 Harvard 仪器公司); 毛细管(100 μm i. d., 365 μm o. d., 河北永年锐沓色谱器件有限公司)。

胰蛋白酶(trypsin)、核糖核酸酶 A(ribonuclease A)、溶菌酶(lysozyme)和肌红蛋白(myoglobin)为美国 Sigma 公司产品;牛血清白蛋白(albumin bovine)(生物技术级)为厦门鹭隆生物公司产品;细胞色素 c(cytochrome c)购自北京鼎国生物技术发展中心;三氟乙酸(TFA)为美国 Sigma 公司产品;二硫苏糖醇(DTT)、碘乙酰胺(IAA)为 Aladdin 公司产品;乙腈(HPLC 级)是美国 Tedia 公司产品;碳酸氢铵(分析纯)购自上海试四赫维化工有限公司;磷酸二氢钠、甲酸、尿素、磷酸(分析纯)购自国药集团化学试剂有限公司;FC-40 油购自美国 Sigma 公司;Portex PE(聚乙烯)管(0.38 mm i. d., 1.09 mm o. d.)购自英国 Smith Medical 公司。

1.2 样品制备

样品采用细胞色素 c、核糖核酸酶 A、溶菌酶、肌红蛋白、牛血清白蛋白 5 种蛋白质酶解产物的混合物。酶解方法为:称取少量胰蛋白酶,用 1 mmol/L HCl 溶解,配制成 0.4 g/L 的酶溶液待用。取约 1 mg 蛋白质溶于 40 mmol/L (pH 8.0) NH₄HCO₃ 缓冲溶液中,加入 16 μL 50 mmol/L 的 DTT 溶液并在 56 °C 水浴中保持 45 min。将蛋白质溶液取出冷却至室温,加入 54 μL 55 mmol/L 的 IAA 溶液后于暗处放置 30 min。然后向体系内加入适量胰蛋白酶溶液,使得蛋白质与酶的质量比为 50:1,于 37 °C 水浴中保持 2 h。再次向体系内加入与第一次加入量等同的酶溶液,于 37 °C 水浴中过夜。最后向体系内加入 10 μL 甲酸终止酶解反应。

1.3 芯片制备

本文使用的两种微流控芯片的构型见图 1。第一种为液滴生成芯片,使用了正交结构将色谱流出物“切割”产生液滴。第二种为油相排除芯片,用以排除间隔油相完成单个液滴的提取,即:使得液滴重新融入到连续的水相中,完成对毛细管电泳的进样。其中的 Pillar 小柱结构(所谓 Pillar 小柱,是指“桥墩”状的 PDMS(聚二甲基硅氧烷)结构,彼此间由较窄的微孔道分隔开)用以完成该油相滤除功能。本文采用模塑法制备这两种 PDMS 微流控芯片。首先由 AutoCAD 软件绘出如图 1 所示芯片结构(包括各主流路孔道和形成 Pillar 小柱的微孔道)并制成相应的掩膜,再通过光刻技术将所设计孔道结构制成 SU-8 阳模作为芯片母版。以质量比 10:1 将 PDMS 的前聚体与固化试剂混合,充分搅拌使其混合均匀,然后将该混合液浇注于 SU-8 阳模上,置于真空干燥器内抽气排尽混合液中气泡,最后在 65 °C 干燥箱中固化 1 h。将固化后的聚合物材料从阳模

上剥离,即可得到带有微孔道的芯片基片,用打孔器在基片适宜位置打孔(与外管路连接),然后与基底封接完成芯片的制备。以上实验步骤均在超净室内完成。

1.4 实验步骤与实验条件

全二维分离的第一维使用反相液相色谱模式,采用 CAPCELL PAK MG C18 反相柱,流动相 A: $H_2O+0.05\%$ TFA, B: $ACN+0.05\%$ TFA。梯度洗脱: $1\%B$ (7 min), $1\%B\sim 5\%B$ (1 min), $5\%B\sim 50\%B$ (17 min), $50\%B\sim 80\%B$ (1 min), $80\%B$ (10 min)。进样量: $20\ \mu L$,流速: $100\ \mu L/min$,紫外检测波长: $214\ nm$ 。第二维分离使用毛细管区带电泳,分离电压 $10\ kV$,背景电解质为 $10\ mmol/L$ 磷酸

盐缓冲液($pH\ 3.0$),毛细管柱总长为 $28.0\ cm$,有效长度为 $16.0\ cm$,紫外检测波长为 $214\ nm$ 。

液滴接口部分主要为两个微流控芯片。首先采取柱后分流(分流比 $300:1$)的方式将反相色谱洗脱下来的样品部分引入正交构型的液滴生成芯片;同时使用注射泵将油相引入,油相的流速为 $1.2\ \mu L/min$,两相在交界处形成液滴(见图 1)。液滴生成频率为 $0.8\ Hz$,每一个液滴的体积约为 $10\ nL$ 。这样,经反相色谱分离后的样品以液滴的形式按洗脱顺序进行封存,并使用内壁疏水的 PE 管对液滴进行收集。接下来,使用注射泵以恒流模式将收集的液滴引入油相排除芯片,第二维分离用的毛细管水平插入分离孔道中(见图 1)。

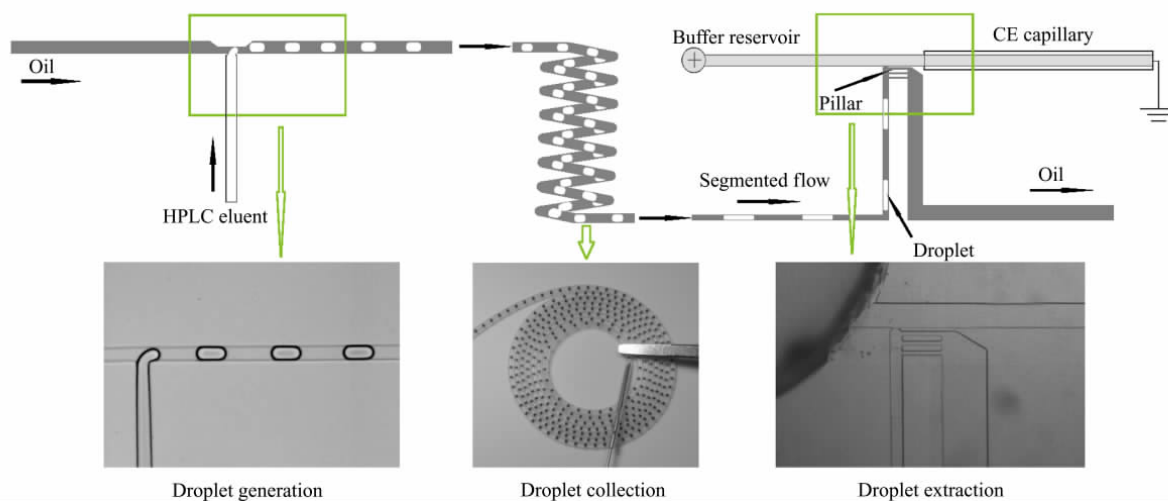


图 1 液滴接口的二维液相色谱-毛细管电泳耦联示意图及实物照片

Fig. 1 Schematic diagram and photographs of droplet-interfaced two dimensional coupling of liquid chromatography and capillary electrophoresis

From left to right: droplet generation chip, droplet collection tubing and droplet extraction chip, corresponding images are shown below.

2 结果与讨论

多维分离是通过耦合两种或两种以上的分离技术来完成一次分离分析,样品经过第一维分离后被引入另外一种或多种相互独立的分离模式中进行更为深入的分离。Giddings 提出了构建理想多维分离的两条准则^[20,21],首先维与维之间必须是正交的,即每一分离维度必须是基于分析物不同的物理化学特性进行分离。液滴接口的二维分离平台在第一维使用了反相色谱,基于多肽的疏水性差异进行分离;其第二维采用毛细管区带电泳模式,基于多肽分子在直流电场中的电泳淌度差异进行分离,这两个分离维度之间是正交的。

Giddings 提出的第二条准则是:在后续的分离维度中不应损失第一维已经获得的分辨率,即样品

在维与维之间转移过程中不应出现区带展宽或组分返混的现象。为了最大限度地保持第一维的分辨率,每一个第一维分离获得的组分峰应至少分 3 次进样至下一维进行分离^[22]。为保证对第二维较高的进样频率,广泛报道的在线 LC-LC 二维耦合模式的第一维往往在低于最佳流速条件下运行,且第二维需使用短柱进行快速洗脱,这样,每一分离维度的最大分离效能未得到充分发挥。而离线的 LC-LC、LC-CE 耦合模式需要对第一维的样品进行收集,会不可避免地造成已分离组分的返混,并伴有样品污染甚至丢失,且操作也较为繁琐。

基于液滴接口的二维耦合方式将反相色谱流出物的连续流转变为非连续流,以离线的方式耦合两种不同的分离模式,这为每一维度分离条件的优化提供了方便,使每一分离维度的分辨率得到充分发

挥。同时,在接口处样品由于被分别封装在相互独立的微液滴中,在从上一维至下一维的转移过程中这些样品单元不会出现进一步的扩散和彼此的返混,从而保持了第一维已经获得的分辨率以及整个二维系统的高峰容量。在具体的操作中,液滴收集管首先连接于第一张芯片,第一维液相色谱分离的流出物通过第一张液滴生成芯片被封装为多个独立的液滴,彼此由油相间隔。在第一维分离完成后,将液滴收集管与第一张芯片分离,并连接于第二张芯片。通过第二张“油相排除”芯片,这些封装有色谱流出物的液滴被逐一进样至第二维的毛细管电泳进行进一步的分离。当对一个液滴进行电泳分析时,下游的液滴保持停留并始终被油相所间隔,可以有效地避免液滴自身的扩散和液滴间的返混。

图 1 中所示油相排除芯片的 Pillar 小柱结构在油相排除过程中起到了关键作用,油相通过 Pillar 小柱间的细孔道得以滤除,而液滴向上移动与电泳分离通道中的缓冲溶液融合,从而完成对第二维毛细管电泳的进样过程。油相之所以由旁路排出是基于两种作用:其一,由于 PDMS 为疏水表面,非连续流中的油相为疏水而水相液滴为亲水,基于表面张力的不同,油相趋于由旁路流出。其二,Pillar 小柱结构两侧,即,液滴流输入孔道和油相排出孔道,存在明显宽度差,显然宽孔道的低背压有利于油相流体的导出。利用此两种作用,油相可有效地由旁路排出,同时水相液滴可顺利地向上进入电泳通道的水相缓冲液体系中。

如图 2 所示,第一维反相色谱在 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的流速下运行,采用了较快的梯度洗脱(21 min),第一个洗脱出来的组分的保留时间为 14.90 min,最后一个组分的保留时间为 35.85 min,平均峰底宽度约为 0.24 min,第一维反相色谱的峰容量为 87。接口处液滴以 0.8 Hz 的频率生成,保证了第一维分离的每一个组分峰在第二维分离中多次进样。与此同时,液滴被油相所间隔,避免了区带展宽和彼此返混的现象发生,使第一维反相色谱获得的分辨率得到有效的保留。非连续的液滴流经油相排除后,每一个液滴样品单元逐个进入毛细管电泳的分离通道中进行第二维分离,见图 3。毛细管电泳分离采用 10 kV 的直流电压,其中最先出峰组分的电泳迁移时间为 2.30 min,最后出峰组分的迁移时间为 11.36 min。抽取第二维分离中的一张毛细管电泳谱图(见图 4)进行峰容量估算(这里选取了较优的电泳谱图进行估算),将谱图中所有峰的峰宽进行平均可求得平均峰底宽度约为 0.25 min,以此为标准计算

第二维毛细管区带电泳的峰容量为 36。两种正交的分离模式耦合的多维分离的峰容量为其各自峰容量的乘积,估测该二维分离系统的总峰容量为 3 132。该峰容量优于采用其他接口技术的二维分离所报道的几百至上千的峰容量^[23,24],并达到与二维凝胶电泳近乎相当的分辨率^[25],这也充分说明了液滴微流控作为一种全新的接口技术在耦合多维分离模式方面的可行性和有效性。

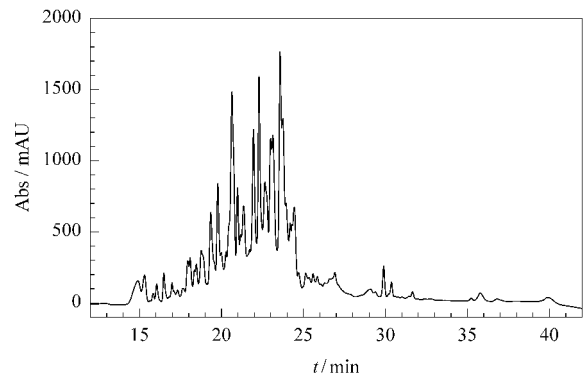


图 2 5 种蛋白质降解混合物的一维反相液相色谱分离
Fig. 2 One dimensional RPLC separation of a five-protein digest

Column: CAPCELL PAK MG C18, 2.0 mm \times 150 mm, 5 μm . Mobile phases: A. $\text{H}_2\text{O} + 0.05\% \text{TFA}$; B. $\text{ACN} + 0.05\% \text{TFA}$; gradient elution: 1%B (7 min), 1%B–5%B (1 min), 5%B–50%B (17 min), 50%B–80%B (1 min), 80%B (10 min). Injection: 20 μL . Flow rate: 100 $\mu\text{L}/\text{min}$. UV detection: 214 nm.

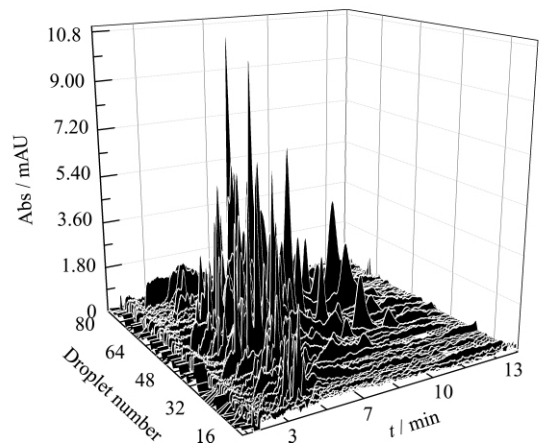


图 3 基于液滴接口的二维反相液相色谱-毛细管电泳分离 5 种蛋白质降解混合物的色谱-电泳谱图
Fig. 3 Separation of a mixture of five protein digest based on a droplet-interfaced 2D RPLC-CZE platform

RPLC conditions are the same as in Fig. 2. CZE conditions: applied voltage, 10 kV; background electrolyte, 10 mmol/L phosphate buffer at pH 3; capillary length, 28.0 cm total, 16.0 cm effective; UV detection, 214 nm.

3 结论

本文基于微液滴接口技术构建了高峰容量的

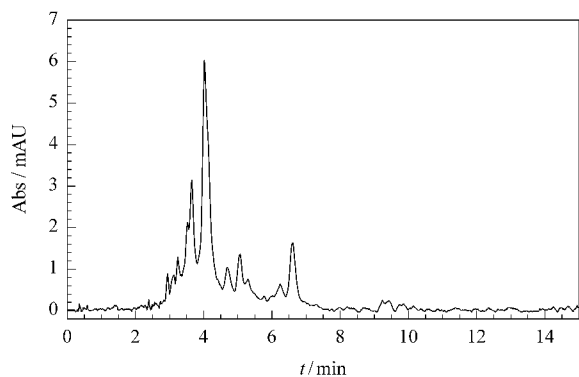


图 4 第 53 滴液滴的毛细管电泳分离谱图
Fig. 4 Electropherogram of No. 53 droplet
CE conditions as in Fig. 3.

RPLC-CZE 二维分离平台,初步展示了其在蛋白质组学研究中的应用前景。液滴微流控接口技术在耦合正交分离模式方面有着微体积、低扩散、无返混等独特优势。液滴接口应用不仅仅局限于反相色谱和毛细管电泳的二维耦合模式,其他的高效分离模式均可被采用以构建高峰容量的分离平台。基于液滴接口耦合的多维分离技术有望在复杂体系的分离分析中发挥重要作用。

参考文献:

- [1] Anderson N L, Anderson N G. *Mol Cell Proteomics*, 2002, 1(11): 845
- [2] Issaq H J. *Electrophoresis*, 2001, 22(17): 3629
- [3] Evans C R, Jorgenson J W. *Anal Bioanal Chem*, 2004, 378(8): 1952
- [4] Zhang Y K, Zhang W B, Zhang L H. *Chinese Journal of Chromatography* (张玉奎, 张维冰, 张丽华. 色谱), 2003, 21(4): 299
- [5] Zhu G J, Liang Z, Zhang L H, et al. *Chinese Journal of Chromatography* (朱贵杰, 梁振, 张丽华, 等. 色谱), 2009, 27(5): 518
- [6] Ma Y, Zhang W J, Wei J Y, et al. *Chinese Journal of Chromatography* (马岩, 张万军, 卫军营, 等. 色谱), 2011, 29(3): 205
- [7] Rabilloud T. *Proteomics*, 2002, 2(1): 3
- [8] Hooker T F, Jorgenson J W. *Anal Chem*, 1997, 69(20): 4134
- [9] Washburn M P, Wolters D, Yates J R. *Nat Biotechnol*, 2001, 19(3): 242
- [10] Kraly J R, Jones M R, Gomez D G, et al. *Anal Chem*, 2006, 78(17): 5977
- [11] Liu H C, Zhang L H, Zhu G J, et al. *Anal Chem*, 2004, 76(21): 6506
- [12] Gu X, Deng C H, Yan G Q, et al. *J Proteome Res*, 2006, 5(11): 3186
- [13] Gao M X, Guan X, Hong G F, et al. *Chinese Journal of Chromatography* (高明霞, 关霞, 洪广峰, 等. 色谱), 2009, 27(5): 551
- [14] Tao D Y, Qiao X Q, Sun L L, et al. *J Proteome Res*, 2011, 10(2): 732
- [15] Mark D, Haeberle S, Roth G, et al. *Chem Soc Rev*, 2010, 39(3): 1153
- [16] Teh S Y, Lin R, Hung L H, et al. *Lab Chip*, 2008, 8(2): 198
- [17] Zhang K, Hu P, Liang Q L, et al. *Chinese Journal of Analytical Chemistry* (张凯, 胡坪, 梁琼麟, 等. 分析化学), 2008, 36(4): 556
- [18] Song W B, Dong Z Q, Ren J C. *Journal of Analytical Science* (宋文斌, 董朝青, 任吉存. 分析科学学报), 2011, 27(1): 106
- [19] Niu X Z, Zhang B, Marszalek R T, et al. *Chem Commun*, 2009(41): 6159
- [20] Giddings J C. *Anal Chem*, 1984, 56(12): 1258A
- [21] Giddings J C. *J High Resolut Chromatogr Chromatogr Commun*, 1987, 10(5): 319
- [22] Murphy R E, Schure M R, Foley J P. *Anal Chem*, 1998, 70(8): 1585
- [23] Opiteck G J, Lewis K C, Jorgenson J W, et al. *Anal Chem*, 1997, 69(8): 1518
- [24] Michels D A, Hu S, Schoenherr R M, et al. *Mol Cell Proteomics*, 2002, 1(1): 69
- [25] Carrette O, Burkhard P R, Sanchez J C, et al. *Nat Protoc*, 2006, 1(2): 812