

聚二甲基硅氧烷(PDMS)/玻璃微流控芯片电泳快速分离 血清高密度脂蛋白亚类及临床应用研究

钱晶晶¹ 季伙燕^{1,2} 丛辉¹ 王惠民*¹ 金庆辉²

¹(南通大学附属医院,南通 226001) ²(上海微系统与信息技术研究所,上海 200005)

摘要 经梯度密度超速离心,高密度脂蛋白(HDL)分为 HDL₂ 和 HDL₃ 两亚型。HDL₂ 抑制低密度脂蛋白(LDL)氧化功能受损是冠心病(CHD)发生发展的关键因素。因此,通过对 HDL 亚类进行分离,从而达到预测和诊断 CHD 的目的。本研究建立了用 PDMS/玻璃微流控芯片快速电泳分离 HDL 亚类的方法。选择 *N*-十二烷基- β -D-麦芽糖苷(DDM)、十二烷基硫酸钠(SDS)和羟丙基纤维素(HPC)共同修饰脂蛋白和泳道表面。在以含 0.3 mmol/L SDS 的 50 mmol/L 3-(*N*-吗啉代)丙磺酸(MOPS)(pH 8.0)为样品缓冲液,含 0.6% HPC 的 50 mmol/L MOPS (pH 8.0)为分离缓冲液,分离电压为 260 V/cm 的优化条件下,HDL₂ 和 HDL₃ 在 4 min 内得到基线分离,二者的出峰时间和峰面积的相对标准差(RSD)分别是 2.0% 和 2.7%,2.0% 和 2.9%,具有较好的重复性。临床标本研究发现,正常人血清标本可分离出 HDL₂ 和 HDL₃ 双峰,而 CHD 患者的 HDL₂ 峰面积显著减小,甚至消失。PDMS/玻璃微流控芯片分离 HDL 亚类是一种简单、快速、高效的用于分析 CHD 危险因子的方法。

关键词 PDMS/玻璃微流控芯片电泳; 冠心病; 高密度脂蛋白亚分

1 引言

流行病学研究表明,氧化低密度脂蛋白(LDL)在冠心病(CHD)的发病过程中发挥关键作用^[1,2],而高密度脂蛋白(HDL)水平与 CHD 发病率呈负相关^[3,4]。过去的研究认为,HDL 对心血管的保护作用是通过逆向转运胆固醇实现的;而最新的研究发现,该作用更多的是依赖其抑制 LDL 氧化实现的^[1]。HDL 抗 LDL 氧化修饰是通过减少 LDL 导致的动脉粥样硬化和抑制单核细胞在动脉管壁的聚集两条途径共同实现的^[4,5]。采用梯度密度超速离心法可将人类 HDL 分为 HDL₂ 和 HDL₃ 两种亚型^[6]。虽然 HDL₃ 比 HDL₂ 抗 LDL 氧化功能更强^[1,2],但 CHD 患者的 HDL₂ 而非 HDL₃ 抗氧化功能受损^[7],具体机制不明。

近年来,多聚物在微流控领域中的应用日益广泛,其中 PDMS 是迄今为止最常用于微流控芯片制备的多聚物^[8,9]。PDMS 是一种常见的高分子聚合有机材料,具有价格低廉,易于构筑,透光、化学性质稳定,易于与玻璃等其它材料键合,无毒及生物兼容性好等优点。但也存在多孔疏水、表面电荷低、电渗流(EOF)小等缺点。因此,在未经修饰的 PDMS 微流控芯片上进行蛋白分离时,常出现峰拖尾和不能有效分离的现象^[10-12]。对 PDMS 进行表面修饰是一种拓宽其应用范围的有效方法,目前的修饰方法种类众多,其中动态修饰是一种最简单有效的方法,通常是在缓冲液中加入类似多聚物或表面活性剂等物质^[13]。

目前 HDL 亚类的分析方法主要有超速离心法^[19]、梯度凝胶电泳法^[20]、质子核磁共振光谱法^[21]、免疫亲和层析法^[22]、双向电泳-免疫印迹法^[23]等,这些方法多存在费时耗力,技术要求高及仪器复杂等不足,更多的是进行基础研究实验,难于在临床应用。二氧化硅微流控芯片电泳法是目前 HDL 亚类分离最简便有效的方法^[24],但二氧化硅构筑微流控芯片价格昂贵、耗时,且需要特殊设备,还受特殊加工工艺的限制。而 PDMS/玻璃微流控芯片分离法是一种适合于临床实验室大规模应用的 HDL 亚类分离法。本研究采用 PDMS/玻璃微流控芯片进行 HDL 亚类分离的研究。选择 DDM、SDS 和 HPC 共同修饰脂蛋白和泳道表面后,明显减弱了 PDMS 对 HDL 的吸附,并在优化各种分离条件下,成功使血清标本 HDL₂ 和 HDL₃ 亚分得到基线分离,且具有很好的重复性。

2011-03-15 收稿; 2011-05-17 接受

本文系国家高技术研究发展计划 863 (No. 2007AA042106)、江苏省医学重点建设学科(No. XK200723)和上海市科委(No. 08110700200)基金资助项目

* E-mail: ntfyjyk@pub.nt.jsinfo.net

2 实验部分

2.1 仪器、试剂与标本

激光诱导荧光(Laser induced fluorescence, LIF)检测系统(自行研制^[14]); Optima™ L-90K 型超速离心机(美国贝克曼公司); CX 系统电源(0~5000 V)、甩胶机、紫外曝光机(中国科学院上海应用物理研究所)。

HDL 标准品(15.6 g/L), MOPS, DDM, SDS, HPC, 乙二醇、甲醇、异丙醇、丙酮、磷钨酸(PTA)、MgCl₂, KBr, SU-8 负性光刻胶(美国 Sigma 公司); 丙二醇单甲醚乙酸酯(江苏省江阴市江化微电子材料有限公司); 硝基苯并二唑-C6-酰基鞘胺醇(NBD C6-ceramide 美国 Molecular Probes 公司)。所用试剂均为分析纯, 实验用水为二次蒸馏水, 试剂配制好后均用 0.22 μm 滤膜过滤。

标本取自本院经冠状动脉造影证实的 CHD 患者及健康体检者。

2.2 实验方法

2.2.1 芯片制备(图 1 A)

(1) 硅片模板制作 硅片经清洗后涂 SU-8 胶; 以 3000 r/s 离心甩胶 60 s; 前期烘干的温度梯度为 50 °C→60 °C→65 °C→75 °C→85 °C→90 °C→95 °C; 在波长 400 nm、光强 200 mJ/cm² 下曝光 75 s; 后期烘干的温度梯度为 50 °C→60 °C→75 °C→85 °C→95 °C; 硅片于显影液中(丙二醇单甲醚乙酸酯)超声约 10 min, 显影后洗净吹干后备用(涂 SU-8 胶以后的操作须避光)。

(2) PDMS/玻璃微流控芯片制作 PDMS 与固化剂以质量比 10:1 的比例搅拌均匀, 经真空处理后, 将混合物倒入硅片模板上, 置于 90 °C 热板上固化; 将包含泳道部分的 PDMS 切下, 并在相应位置打孔; 将 PDMS 与载玻片共同置于等离子体清洗器中处理后键合。芯片大小为 64 mm×32 mm, 管道宽 100 μm, 深约 25 μm, 样品池到十字交叉点长 4 mm, 有效分离长度为 42 mm, 储液池的直径为 2 mm。样品池 1 和样品废液池 2 间通道用于进样, 缓冲液池 3 和缓冲液废液池 4 间通道用于电泳分离, 如图 1B 所示。

2.2.2 芯片电泳过程

在芯片样品废液池、缓冲液池和缓冲液废液池中分别加入分离缓冲液, 并使通道内充满分离缓冲液; 在样品池中加入样品, 使激光束聚焦于芯片分离通道下检测点处。按下列程序分别向 4 个储液池施加电压, 进行进样和分离操作: 进样 40 s, 样品池、样品废液池、缓冲液池和缓冲液废液池分别施加 450, 0, 150 和 280 V 电压; 分离 4 min, 各池分别施加 300, 300, 2000 和 0 V 电压, 运行温度 25 °C^[7]。

2.2.3 电泳原理

PDMS/玻璃芯片泳道表面经 DDM 修饰后, 管壁净电荷为零, 泳道内 EOF 也几乎消失。HDL 是一种酸性脂蛋白, 在 pH 8.0 的缓冲液中带负电荷。因此, HDL 在 PDMS 分离泳道中只受外加电场力作用, 由负极向正极迁移, 通过末端检测器检测得到电泳图谱。

3 结果与讨论

3.1 DDM, HPC 共同修饰后 HDL 亚类的分离效果

根据本课题组先前的研究结果^[22], 选用 DDM 和 HPC 共同修饰泳道表面。DDM 属于温和型非离

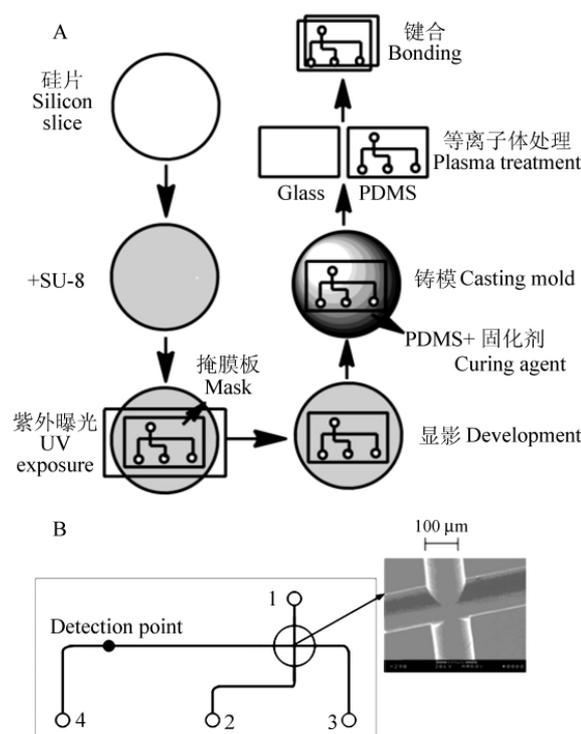


图 1 A. PDMS/玻璃微流控芯片制作流程, B. 微流控芯片结构示意图

Fig. 1 Production process of polydimethylsiloxane (PDMS)/glass microchip (A); Structure for microchip (B)

1. 样品池 (Sample reservoir); 2. 样品废液池 (Sample waste reservoir); 3. 缓冲液池 (Buffer reservoir); 4. 缓冲液废液池 (Buffer waster reservoir)。

子型表面活性剂,能强烈吸附于疏水表面并形成亲水性非离子性单层,从而减少蛋白对于疏水表面的吸附。HPC 是一种纤维素衍生物,在蛋白质分离时可作为筛分介质来填充泳道。HPC 在较高浓度时也不会导致粘滞性增加,因此可方便地进行泳道灌注^[15]。用 0.01% DDM 修饰泳道 30 min 后,以含 0.6% HPC 的 50 mmol/L MOPS (pH 7.2) 作为分离缓冲液,50 mmol/L MOPS (pH 7.2) 作为样品缓冲液。HDL 标准品、超速离心所得 HDL 亚型及其混合物的分离效果见图 2。

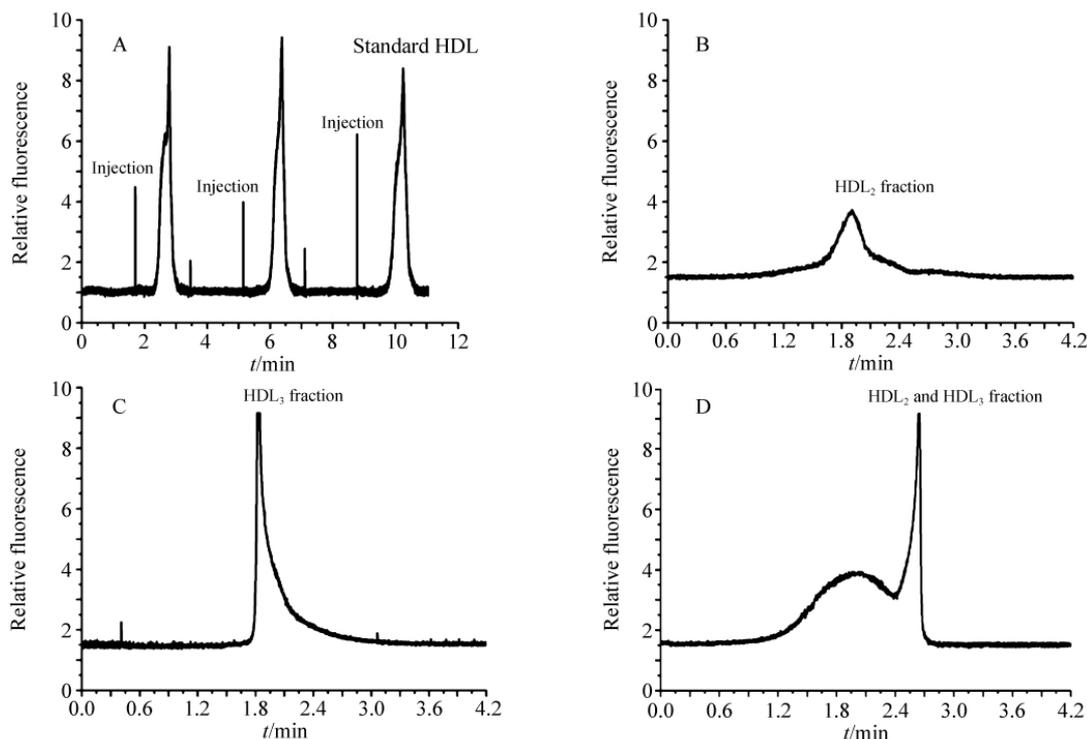


图 2 HDL 亚类分离

Fig. 2 High density lipoprotein (HDL) subclasses separation

A. HDL 标准品连续 3 次进样分离 (Three consecutive injections for separating of standard HDL); B. 超速离心所得 HDL₂ 亚类分离 (Separation of HDL₂ obtained by ultracentrifugation); C. 超速离心所得 HDL₃ 亚类分离 (Separation of HDL₃ obtained by ultracentrifugation); D. 超速离心所得 HDL₂ 和 HDL₃ 混合物的分离 (Separation of HDL₂ and HDL₃ mixtures obtained by ultracentrifugation).

3.2 SDS 浓度对 HDL 分离效果的影响

在给定 pH 条件下,蛋白质各组分相互分离的根本原因是其质荷比差异^[4, 23],因此要提高 HDL 亚类的分离度,必须增加其亚类间的质荷比。SDS 是一种阴离子表面活性剂,能将脂蛋白外壳的载脂蛋白氢键、疏水键打开,并结合到载脂蛋白上,形成 SDS-脂蛋白复合物,不同的脂蛋白颗粒结合不同数量的 SDS,导致颗粒间的质荷比发生变化,从而提高分离效率。HDL₂ 蛋白含量高于 HDL₃,因此 HDL₂ 可结合更多数量的 SDS,所带负电荷更多,迁移速度也更快^[4]。依据此理论,研究了含不同 SDS 浓度的样品缓冲液对 HDL 亚分分离度的影响。结果表明,在 pH 7.2、50 mmol/L MOPS 样本缓冲液中加入 0.3 mmol/L SDS,可使 HDL₂ 和 HDL₃ 亚分得到基线分离,SDS 浓度过小或过大,分离效果都欠佳,如图 3 所示。

3.3 pH 值对 HDL₂ 和 HDL₃ 分离度的影响及 HDL 亚类峰型的鉴定

通过调节 pH 值的进一步优化 HDL₂ 和 HDL₃ 的分离条件。当缓冲液 pH=8.0 时, HDL₂ 和 HDL₃ 的分离度最大,结果如图 4A 所示。在此优化条件下,将超速离心所得 HDL₂ 与 HDL₃ 混合物和 HDL 标准品分别进行了电泳分离,结果如图 4B 和图 4C 所示。为了研究图 4B 和图 4C 两峰分别属于何种亚型,在 HDL 标准品中分别加入了 HDL₂ 和 HDL₃,结果发现,加入 HDL₂ 亚型的标准品,前迁移峰面积显著增加;加入 HDL₃ 亚型的标准品,后迁移峰面积显著增加(图 4D 和图 4E)。说明 PDMS/玻璃微流控芯片电泳分离 HDL 亚型时, HDL₂ 的迁移速度比 HDL₃ 快。

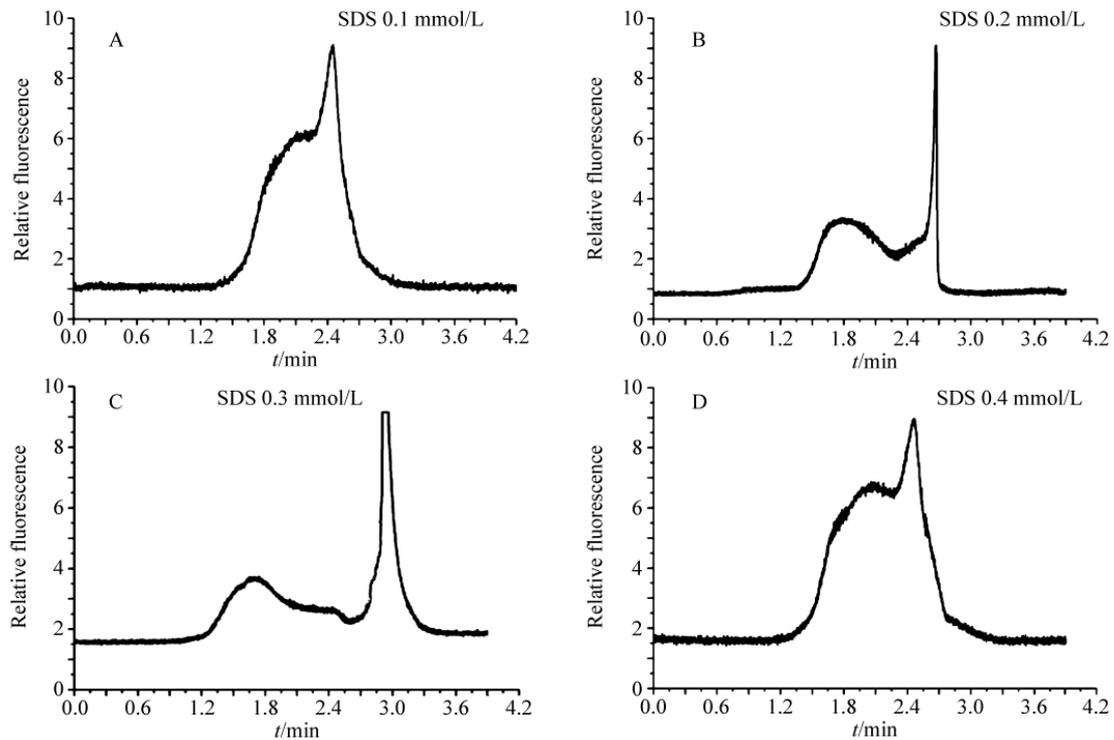


图3 SDS 浓度对 HDL 标准品分离的影响

Fig. 3 Effect of SDS concentration on standard HDL separation

样品缓冲液中 SDS 浓度(Concentration of SDS in sample buffer): A. 0.1 mmol/L; B. 0.2 mmol/L; C. 0.3 mmol/L; D. 0.4 mmol/L.

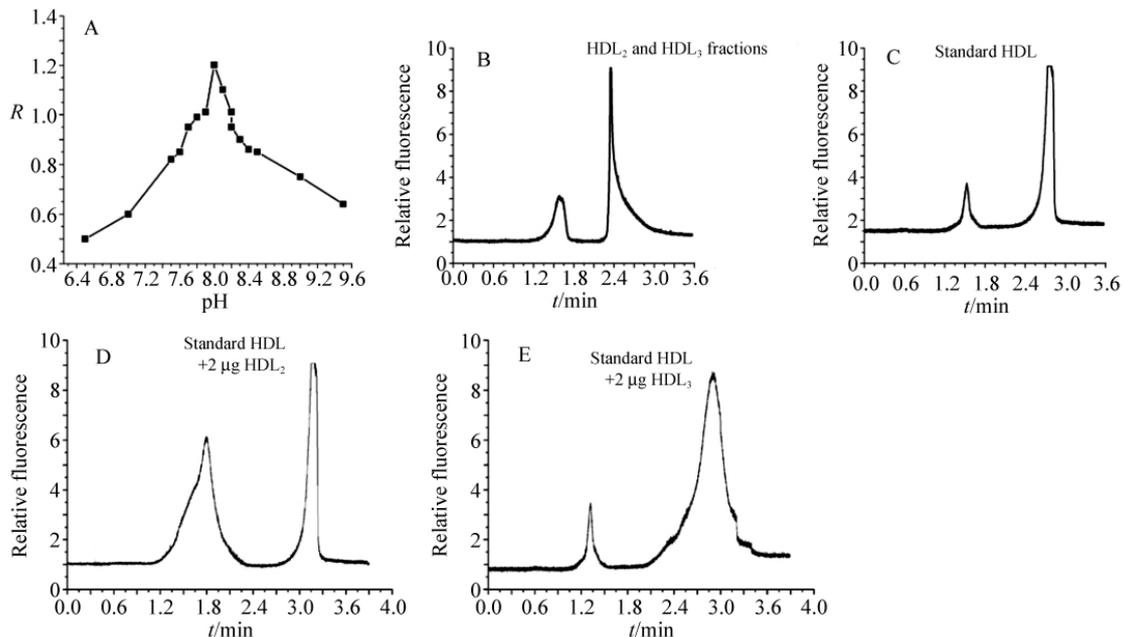


图4 A. pH 值对 HDL₂ 和 HDL₃ 分离度的影响; B. 超速离心所得 HDL₂ 和 HDL₃ 混合物的基线分离; C. HDL 标准品的基线分离; D. 在 HDL 标准品中加入超速离心所得 HDL₂ 亚分; E. 在 HDL 标准品中加入超速离心所得 HDL₃ 亚分

Fig. 4 A. Effect of pH on resolution of HDL₂ and HDL₃; B. Baseline separation of HDL₂ and HDL₃ mixtures obtained by ultracentrifugation; C. Baseline separating of standard HDL; D. Added HDL₂ obtained by ultracentrifugation to standard HDL; E. Added HDL₃ obtained by ultracentrifugation to standard HDL.

3.4 重复性研究

将 HDL 标准品连续 5 次进样分离, HDL₂ 和 HDL₃ 的出峰时间和出峰面积的标准偏差分别为 2.1% 和 2.7%, 2.0% 和 2.9%, 显示重复性良好。

3.5 临床血清标本 HDL 亚类分析

采用 PTA-Mg²⁺ 沉淀剂 (1.52 mmol/L PTA, 0.05 mol/L MgCl₂, pH=6.1)^[9] 将血清标本中除 HDL 外的脂蛋白通过超速离心沉淀除去, 则上清液中所含脂蛋白即 HDL^[24]。处理后血清中的荧光信号是 NBD-C6 标记的 HDL 所产生。由健康体检者和 CHD 患者血清标本电泳分离 HDL 亚类结果(图 5) 可见, 健康体检者有 HDL₂ 和 HDL₃ 双峰, 而 CHD 患者 HDL₂ 峰面积显著减小, 甚至消失。这可能是由于 CHD 患者体内 HDL₂ 抗 LDL 氧化功能受损所致。

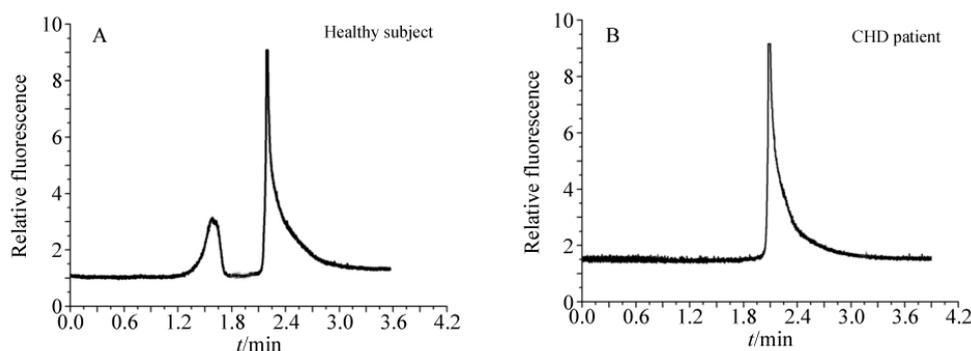


图 5 临床血清标本中 HDL 亚类分析

Fig. 5 Clinical serum HDL subclasses assay

A. 健康体检者 (Healthy subject); B. CHD 患者 (Coronary heart disease (CHD) patient)。

3.6 CHD 患者与健康体检者 HDL 亚类峰面积的统计学分析

采用 SPSS 11.0 软件进行统计学处理, 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表达。组间差异比较使用方差分析, $p < 0.05$ 有显著性差异。表 1 为受试血清标本 HDL₂ 和 HDL₃ 峰面积的统计学分析结果。CHD 患者 HDL₂ 峰面积显著低于健康体检者组 ($p < 0.01$), 而 HDL₃

表 1 临床血清标本中 HDL 亚类峰面积的统计学分析
Table 1 Peak area of clinical serum HDL subclasses statistical analysis

	CHD (n=41)	Healthy subjects (n=39)
Area of HDL ₂	0.231±0.084*	0.603±0.091
Area of HDL ₃	1.357±0.087	1.239±0.075

* : CHD 患者 HDL₂ 峰面积与健康体检组相比, $p < 0.01$, 差异有统计学意义。* : Compared with Healthy subjects, $p < 0.01$ 。

峰面积与健康体检者组相比, 差异无统计学意义, 提示 HDL₂ 含量减少是 CHD 发生的危险因素。

本研究结果表明, 以 PDMS/玻璃微流控芯片电泳技术为平台, 结合 LIF 检测系统, 血清 HDL 亚类分离的稳定性和重复性均较好, 芯片构筑简单、费用低廉, 且可一次性使用, 弥补了二氧化硅芯的不足, 具有较高的临床应用价值。

References

- 1 Yoshikawa M, Sakuma N, Hibino T. *Clin. Biochem.*, **1997**, 30(3): 221 ~ 225
- 2 Kontosh A, Chantepie S, Chapman M J. *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.*, **2003**, 23(10): 1881 ~ 1888
- 3 Rey K A, Bursill C A, Lambert G. *J. Lipid. Res.*, **2009**, Suppl.: S195 ~ S200
- 4 Cho K H. *BMB Rep.*, **2009**, 42(7): 393 ~ 400
- 5 Cooney M T, Dudina A, De Bacquer D, Wilhelmsen L, Sans S, De Backer A G, Jousilahti P, Keil U, Thomsen T, Whincup P, Graham I M. *Atherosclerosis*, **2009**, 206(2): 611 ~ 616
- 6 Barter P J, Nicholls S, Rye K A. *Circ. Res.*, **2004**, 95(8): 764 ~ 772
- 7 Forti N, Diamant J. *Arq. Bras. Cardiol.*, **2006**, 87(5): 671 ~ 679
- 8 Gowri M S, Van der Westhuyzen D R, Bridges S R, Anderson J W. *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.*, **1999**, 19(9): 2226 ~ 2233
- 9 Zhou J, Ellis A V, Voelcker N H. *Electrophoresis*, **2010**, 31(1): 2 ~ 16

- 10 Kang J , Yan J , Liu J , Qiu H , Yin X B , Yang X , Wang E. *Talanta* , **2005** , 66(4) : 1018 ~ 1024
- 11 Han B , Xu Y , Zhang L , Yang X , Wang E. *Talanta* , **2009** , 79(3) : 959 ~ 962
- 12 Dou Y H , Bao N , Xu J J , Chen H Y. *Electrophoresis* , **2002** , 23(20) : 3558 ~ 3566
- 13 Dou Y H , Bao N , Xu J J , Meng F , Chen H Y. *Electrophoresis* , **2004** , 25(17) : 3024 ~ 3031
- 14 Sia S K , Whitesides G M. *Electrophoresis* , **2003** , 24(21) : 3563 ~ 3576
- 15 Sanders J C , Breadmore M C , Kwok Y C , Horsman K M , Landers J P. *Anal. Chem.* , **2003** , 75(4) : 986 ~ 994
- 16 Havel R J , Eder H A , Bragdon J H. *J. Clin. Invest.* , **1995** , 34(9) : 1345 ~ 1353
- 17 Blanche P J , Gong E L , Forte T M , Nichols A V. *Biochim. Biophys. Acta* , **1981** , 665(3) : 408 ~ 419
- 18 Chung C P , Oeser A , Raggi P , Solus J F , Avalos I , Linton M F , Fazio S , Stein C M. *Clin. Rheumatol* , **2008** , 27(10) : 1227 ~ 1233
- 19 Lanningham F L , Boudyguina E Y , Lee J Y , Lanningham-Foster L , Boudyguina E Y , Smith F L , Young E R , Colvin P L , Thomas M J , Farks J S. *J. Lipid. Res.* , **2004** , 45(4) : 716 ~ 728
- 20 TIAN Ying , LONG Shi-Yin , XU Yna-Hua , FU Ming-De , ZHANG Xue-Mei , HU Bing-Wen. *Chinese Journal of Medical Genetics* , **2005** , 22(1) : 96 ~ 98
田英 , 龙石银 , 徐燕华 , 傅明德 , 张雪梅 , 胡秉文. *中国医学遗传学杂志* , **2005** , 22(1) : 96 ~ 98
- 21 Zheng H F , Cong H , Wang H M , Jin Q H , Zhao J L. *Chromatographia* , **2010** , 71: 1119 ~ 1124
- 22 Dias V C , Parsons H G , Boyd N D , Keane P. *Clin. Chem.* , **1988** , 34(11) : 2322 ~ 2327
- 23 Ping G , Zhu B , Jabasini M , Xu F , Oka H , Sugihara H , Baba Y. *Anal. Chem.* , **2005** , 77(22) : 7282 ~ 7287
- 24 Ansell B J , Navab M , Hama S , Kamranpour N , Fonarow G , Hough G , Rahmani S , Mattahedeh R , Davi R , Reddy S , Fogelman A M. *Circulation* , **2003** , 108(22) : 2751 ~ 2756

Application of Polydimethylsiloxane/Glass Microchip for Fast Electrophoretic Separation of Serum High-density Lipoprotein Subclasses

QIAN Jing-Jing¹ , JI Huo-Yan^{1 2} , CONG Hui¹ , WANG Hui-Min^{* 1} , JIN Qing-Hui²

¹(Affiliated Hospital of Nantong University , Nantong 226001)

²(Shanghai Institute of Microsystem and Information Technology , Shanghai 200005)

Abstract On the basis of density by ultracentrifugation , high density lipoprotein (HDL) can be separated into two major subfractions: HDL₂ and HDL₃. The capacity of HDL₂ , but not of HDL₃ , to inhibit the oxidative modification of low density lipoprotein (LDL) is impaired , which is believed to play a central role in coronary heart disease (CHD) , so HDL subclasses separation is necessary for CHD prediction and diagnosis. In this paper , polydimethylsiloxane(PDMS) /glass microchip was used. We chose DDM , SDS and HPC to modify both lipoprotein and the channel surface to reduce lipoprotein adsorption and improve the resolution of lipoprotein separation. Under the optimal conditions , HDL₂ and HDL₃ were effectively baseline separated with high reproducibility. RSD values of the migration time and peak areas of HDL₂ and HDL₃ were 2.1% and 2.7% , and 2.0% and 2.9% , respectively. Serum HDL subclasses of healthy ones and patients with CHD were separated by PDMS-based microchip. Two peaks (HDL₂ and HDL₃) were detected in serum samples of healthy ones while HDL₂ fractional peaks almost disappeared in patients' entire serum samples. These results suggested that PDMS/glass microchip-based HDL subclasses assay was a simple , rapid , and highly efficient technique for CHD risk factors analysis.

Keywords Polydimethylsiloxane/glass microchip electrophoresis; Coronary heart disease; Subclasses of high density lipoprotein

(Received 15 March 2011; accepted 17 May 2011)