2010年 8月

DOL 10 3724/SP. J 1096 2010 01100

自由溶液和筛分介质条件下芯片 DNA 瞬间等速电泳预浓缩的比较

刘大渔 梁广铁 雷秀霞 周小棉^{*} (广州医学院附属市-人民医院检验科临床化学技术研究室,广州 510180)

摘 要 利用芯片电泳方法考察瞬间等速电泳-筛分电泳偶联分析的结果,比较了自由溶液和筛分介质中 DNA瞬间等速电泳的预浓缩效果。结果显示,相比较于筛分介质条件,自由溶液瞬间等速电泳有利于改善预 浓缩和后续筛分电泳分离效果。对此结果的解释是:自由溶液条件下 DNA 迁移速度的提高可以延长瞬间等 速电泳持续时间,有利于提高预浓缩效率。此外,样品压缩区带在自由溶液-筛分介质界面的二次富集也是预 浓缩效果得到改善的原因之一。

关键词 芯片电泳; 等速电泳; 预浓缩; 脱氧核糖核酸

1 引 言

在线预浓缩是一种简便有效的提高毛细管电泳和芯片电泳检测灵敏度的手段^[1]。用于 DNA 在线 预浓缩的方法包括碱堆积 (Base stacking)^[2]、场放大堆积 (Field-am plified san ple stacking)^[3]和等速电泳 (Isotachophoresis, IIP)预浓缩^[4-5]等。瞬间等速电泳 (Transient isotachophoresis, IIP) 是一种简化的等 速电泳预浓缩方式,以样品基质中的离子为前导或尾随离子,可以简化操作并良好地兼容高盐样 品^[6-7]。通过偶联 tITP和筛分电泳 (CGE),可以简单有效地实现高盐 DNA 样品的预浓缩和分离^[8-9]。 瞬间等速电泳预浓缩效果取决于前导离子浓度和等速电泳持续时间,而后者由样品基质与样品离子以 及样品基质与背景缓冲液中同离子的迁移速度差决定^[10]。 Liu等^[8]发现,筛分介质条件下较低的 DNA 迁移速率是限制 tITP预浓缩效率的因素,提高样品迁移速率有利于改善预浓缩效果; Schans等^[11]指 出,从 tITP到 CGE 的分离模式转换可以在自由溶液 筛分介质界面实现。微流控芯片具有设计灵活的 特点和优势,非常适合于实现这种复合式分离; Q^[12]和W ang^[13]等分别报道了基于芯片的自由溶液 ITP 或 tITP与 CGE偶联用于 DNA 预浓缩和分离。这些研究结果显示自由溶液中 DNA 样品具有更高的预 浓缩效率,有利于提高后续 CGE 的分离效果。

本研究采用激光诱导荧光检测芯片电泳方法,比较了在自由溶液和筛分介质条件下芯片 DNA 瞬间 等速电泳预浓缩效果并分析了相关机制,为改善tIPP与 CGE 偶联分离效果进行了有益的尝试。

2 实验部分

21 仪器与试剂

涂有正光刻胶的玻璃基板 (6 5 m × 6 5 m, 长沙韶光铬版有限公司)。咪唑, N-(乙-羟乙基)哌 嗪 N-二乙烷磺酸 (HEPES, 美国 Sign a 公司); 羟丙甲基纤维素 (Hydroxyprolymethyl cellulose HPMC, 2% 水溶液, 粘度为 40~60 cp 美国 A Hrich公司); ΦX 174 H aeIII digests(加拿大 Fermentas公司); 10× PCR 缓冲液 (北京 Tiangen公司); 插入式 DNA标记染料 GeneFinder[™] (厦门 B iovision公司)。

芯片电泳实验在自行设计和研制的芯片电泳分析仪上完成。该仪器由芯片电泳平台、光学检测系统、CCD监测、高压电源控制和操作软件组成,检测方式为共聚焦激光诱导荧光^[8]。

2.2 实验方法

221 芯片设计和制作 芯片结构如图 1所示。图 1a包含用于标准芯片筛分电泳 (标准 CGE)分离

2009-07-07收稿; 2009-10-24 接受

* E-mail zhoux in @ yahoo com

本文系"十一五"重大专项 (Na 2008ZX10004-004), 国家自然科学基金 (Na 30870753)资助

的十字架结构和用于筛分介质条件下瞬间等速电泳-筛分电泳 (tll P-CGE) 偶联分离的双 T 结构 (有效

样品区带长度 7.5 mm); 图 1b结构用于自由溶液瞬间等速 电泳-筛分电泳 (Free-solution tITP-CGE, FstITP-CGE) 偶联 分离, 其底部通道用于进样和 FstITP预浓缩, 顶部通道用于 CGE 分离, 有效样品区带长度也是 7.5 mm。芯片为玻璃材 质, 使用标准光刻 湿法腐蚀 热封接方法加工而成^[5,14]。芯 片通道深度 30 μ m, 半高宽 50 μ m。3种芯片中有效分离通 道长度均为 4.5 m。使用前芯片通道表面使用线性丙烯 酰铵涂层^[15]。

222 芯片电泳 芯片电泳背景电解质为 20 mmol/L HEPES-40 mmol/L 咪唑 (_H 7.5)。实验中使用两种运行 缓冲液,缓冲液 A 是含有背景电解质和 1 × GeneF inder的 自由溶液,缓冲液 B 除含有不同浓度 HPM C 筛分介质,其 余成分与缓冲液 A 相同。缓冲液由二次蒸馏水配制,使用 前过滤。 DNA 的样品基质为 1 × PCR 缓冲液 (10 mmol/L TrisHC1 _pH 8 3 50 mmol/L KC1 2 5 mmol/L M gCb)。

使用标准 CGE和 tITP-CGE模式时,缓冲液 B依次加 在 BW, B和 SW。在 S储液池使用真空泵连续施加负压,



图 1 用于标准 CGE, tTP-CGE(a) 和 FstTP-CGE(b)分析的电泳芯片结构示意图

Fig. 1 Layouts of microchip for standard CGE, transient isotachophoresis($t\Pi P$)-capillary sieving electrophoresis(CGE) (a) and Fst ΠP -CGE (b) analysis

The reservoirs marked are S (sample), SW (sample waste), B (buffer), BW (buffer waste).

所有通道充满筛分介质,最后将样品加于 S储液池。使用 FstITP-CGE 模式时,将缓冲液 B加在 BW,在 BW 1施加负压将筛分介质充满分离通道。再在 B,S和 SW 加入缓冲液 A 并继续在 BW 1施加负压,进 样通道充满缓冲液 A。最后吸走 S储液池中缓冲液,加入样品。各种模式的电分析程序见表 1。

分析模式	步骤	- 时间 Time	不同储液池电极状态 Status of electrode at ind ividual reservoir						
A na lysis m ode	Step	(s)	В	S /S1	S2	SW	BW		
标准 CGE Standard CGE	进样 Injection	30	F	G	N/A	300 V / m	F		
	分离 Separation	500	G	50 V	N/A	50 V	430 V/m		
tIT P-CG E	进样 Injection	30	F	N /A	G	340 V / en	F		
	分离 Separation	500	G	N /A	50 V	50 V	430 V/m		
FstIFP-CGE	进样 Injection	10	F	G	N/A	300 V / am	F		
	分离 Separation	500	G	200 V	N/A	200 V	430 V/am		

表 1 标准 CGE、tITP-CGE和 FstITP-CGE芯片分析的电操作步骤 Table 1 Sequential steps for microchip analysis in standard CGE、tITP-CGE and FstITP-CGE

F. 悬浮 (F bating); G. 接地 (Ground)。 N /A. 不适用 (Not applicable)。

3 结果与讨论

3 1 由溶液和筛分介质条件下 tITP 预浓缩与 CGE 偶联芯片电泳分离机制

DNA 样品缓冲液通常含有高盐分,电进样时由于样品缓冲液离子强度对进样量的影响, DNA 进样量受到抑制,因而影响检测灵敏度。使用 tITP和 CGE 偶联分离模式可以通过进样量的增加提高信号强度。DNA 的迁移速度介于 HEPES和 CI之间。因此, tITP预浓缩选择 HEPES作为尾随离子, CI 作为前导离子。由于样品缓冲液中 CI 的浓度较高,可直接用作前导离子而不必使用其它前导缓冲液,简化了 DNA 预浓缩和分离操作,仅需一种背景缓冲液和 4个电极就可以完成芯片分析操作。

如图 2所示, tITP-CGE和 FstITP-CGE分析都包括进样、tITP预浓缩与 CGE分离 3个步骤。二者区 别在于 tITP-CGE模式下所有步骤在筛分介质中完成,而 FstITP-CGE模式下进样和 tITP预浓缩在自由 溶液中完成。施加分离电压后,CI由于迁移速度快而迅速形成前导区带。CI、DNA 和 HEPES依据迁 移速率形成连续区带,电导率从前导区带到尾随区带依次降低。由于电导率的差异,使得前导区带后 样品区域分担较高场强,因此 DNA 样品区带被压缩成狭窄样品塞。随着分离时间的延长,前导离子浓 度因扩散而逐渐降低。当前导离子浓度降低到一定程度,ITP状态不能够维系而转为 CGE。由于样品 区带在 tITP过程被压缩为狭窄样品塞,后续 CGE 的分离度不会因为进样量增加而损失。因此, tITP和 CGE 偶联分离方式可以简便,有效地提高检测灵敏度。



图 2 芯片电泳 tITP-CGE和 FstITP-CGE分析机制示意图

Fig 2 Illustrations of mechanism of on-chip tll P-CGE and Fstll P-CGE analysis

3 2 自由溶液和筛分介质条件下的瞬间等速电泳预浓缩效果比较

等速电泳的原理是使用含有与样品离子具有不同迁移速率离子的不连续缓冲液,不同离子组分区 域具有同样的迁移速度但分担场强不同。本实验使用背景缓冲液 (_HH 7.5), C Г 迁移速度约为 7.0× 10^{-4} cm² /(V•s), HEPES迁移速度约为 1.0×10⁻⁴ cm² /(V•s)。 DNA 在自由溶液中迁移速度为 3.3× 10^{-4} cm² /(V•s), 而在筛分介质中迁移速度依片段长度有所差别。如 1.5% HPMC 中 72-1353 bp DNA 片段迁移速度介于 2.7×10⁻⁴ cm² /(V•s) (72 bp)到 1.5×10⁻⁴ cm² /(V•s) (1353 bp)之间。在自由 溶液和筛分介质中, DNA 的迁移速度均介于 HEPES和 C f 之间, 因此得以实现 tIIP预浓缩。

tIIP预浓缩效果主要取决于前导离子浓度和 tIIP维持时间,而 tIIP维持时间由样品离子相对于前 导和尾随离子的迁移速度决定。在样品基质中含有前导离子条件下,样品 i的 tIIP维持时间为^[10]:

$$t_{\rm TP} = \frac{l_{\rm S} \cdot \kappa_{\rm S}}{I} \cdot \frac{(\mu_{\rm L} - \mu_{\rm T})}{(\mu_{\rm L} - \mu_{\rm i})^2}$$
(1)

其中, L_s 和 K_s 分别为样品区带长度和其电导率, I是电流, L_i , L_i 和 L_i 分别为前导离子、样品和尾随离 子的迁移速率, $L_i > L_i > L_i$ 。由式 (1)计算发现, 提高 DNA 电泳迁移速度有利于增加 tITP 维持时间。

在 tITP和 CGE 偶联分离中, CGE 分离的半峰宽和塔板效率可以反映 tITP预浓缩效果。实验结果 表明,自由溶液和筛分介质条件下 DNA 瞬间等速电泳预浓缩效果存在差别。半峰宽分析结果 (图 3)显 示,在 tITP-CGE 模式下半峰宽数值随着片段长度和筛分介质浓度的增加而增大。在 tITP-CGE 模式下, 当 HPM C浓度高于 2% 时,峰型明显拓宽。而当使用 3% HPM C时,峰形严重劣化。这是由于 tITP过 程中未能将样品压缩成狭窄区带,而影响 CGE 分离效果。对此的解释是片段长度和筛分介质浓度的增 加都是引起迁移速度降低的因素,因而会造成 tITP维持时间的缩短。 tITP预浓缩效果因为等速电泳时 间的缩短受到限制,并影响了后续 CGE 分离效果。相比之下,FstITP-CGE 模式下,CGE 分离效果几乎 不受片段长度和筛分介质浓度的影响。这是因为自由溶液中 DNA 具有更高的电泳迁移速度,可以增加 tITP维持时间,使得 tITP预浓缩效果得到改善。根据文献 [13,16], DNA 片段在穿越自由溶液 筛分介 质界面时,由于迁移速度突然下降,样品区带被进一步压缩,这也是 FstITP-CGE 分析中预浓缩效果得以 改善的辅助因素。需要指出的是,这种界面富集效应取决于样品离子在界面两侧的迁移速度差,因此高 筛分介质浓度和大片段长度条件下,这种堆积效应更加明显。

□ 由于进样量的提高和瞬间等速电泳样品预浓缩作用,tITP-CGE 法和 FstI P-CGE 法所检测的信号强

度比标准 CGE 法显著提高。在 2% HPMC 条件下,相对于标准 CGE, tITP-CGE 和 FstITP-CGE 法都可以 将信号强度提高 20倍以上。图 4显示,在 2% HPMC 件下, tITP-CGE 和 FstITP-CGE 分析中不同长度 DNA 片段相对于标准 CGE 法分析的信号强度提高系数。因为 DNA 片段迁移速度对于 tITP 预浓缩效 果的影响, tITP-CGE 分析中存在富集倍数随 DNA 片段长度增加而递减的趋势,而在 FstITP-CGE 分析 中,长片段 DNA 依然有非常好的富集效果。



图 3 不同浓度 HPM C条件下 tfr P-CGE和 FstfrP-CGE分 析中 DNA 片段的半峰宽比较

Fig 3 Peak widths at half height in tITP-CGE and FstITP-CGE analysis with various HPM C concentrations

用于分析的 DNA 片段长度是 72, 310, 603 和 1353 bp。样品为 1 mg/L ΦX 174 /H aeIIIDNA digests, 溶解于 1× PCR缓冲液 (The fragments tested were 72, 310, 603 and 1353 bp. The sample was 1 mg/L ΦX 174 /H aeIIIDNA digests in 1× PCR buffer)。



图 4 tITP-CGE和 FstITP-CGE相对于标准 CGE的信 号强度提高系数

Fig 4 Comparison of signal intensity enhancement factor in tITP-CGE and FstITP-CGE standard CGE

HPM C筛分介质浓度为 2%,样品为 1 mg/L ΦX 174/H ae III DNA digests,溶解于 1× PCR 缓冲液 (The sample was 1 mg/L ΦX 174/H ae III DNA digests in 1× PCR buffer and the concentration of HPM C was 2%)。 (○): In tIFP-CGE; (△): In FstIFP-CG,

3 3 由溶液和筛分介质条件下 tITP与 CGE 偶联芯片电泳分离效果的比较

瞬间等速电泳预浓缩所形成的狭窄样品区带有利于提高 CGE 分离效率。在 HPM C 浓度为 2% 条件下, tITP-CGE 和 FstITP-CGE 的总体分离效率较标准 CGE 方法均有所提高 (表 2)。在 tITP-CGE 分析模式下, DNA 片段依据迁移速度先后由 ITP 进入 CGE 分离状态, 小片段 DNA 由于迁移速度快因而 tITP 维持时间较长。从表 2可见, tITP-CGE 分析中 72和 118 bp 片段预浓缩效果良好, 因而在后续 CGE 分离中获得了很高的塔板效率。在 FstITP-CGE 模式下, DNA 片段分离效率得到整体提高, 118 bp 以上片段的分离效率均比 tITP-CGE模式下有所提高, 而且这种趋势随着 DNA 片段长度的增加愈发明显。如 FstITP-CGE 中 1353 bp 片段的分离效率是 tITP-CGE 的 2 倍以上。此结果说明, 与 tITP-CGE 中各个 DNA 片段依次富集的模式不同, FstITP-CGE 是同步富集模式。在自由溶液条件下允许更长的富集时间, 所有 DNA片段被同步压缩成狭窄区带, 因而 FstITP-CGE分析中所有组分都获得比较一致的高分离表 2 标准 CGE、ITP-CGE和 FstITP-CGE芯片分析的理论塔板数和分离度比较 (*n*=5)

											/				
Table 2	Com	parison of	plate	num bers	and	resolutions	from	separations	of	stand ard CG F	, tITF	-CGE a	nd FstITP	-CGE()	n = 5

-	-		-			
	平均理论 Average plate num	塔板数 ber (N×10 ⁻⁵)		平均分离度 A verage resolution	l	
DNA (bp)	标准 CGE Standard CGE	tITP-CGE	FstIFP-CGE	标准 CGE Stand ard CGE	tITP-CGE	FstIIP-CGE
72	0. 7	65	4 5	5.0	0.7	12.7
118	1. 1	53	32	5. 9	9.7	12. 7
194	2.3	1 8	2 5	2.2	2.7	2.2
234	1. 2	1 8	2 4	3. 2	27	32
281	1. 1	1 7	2 3	2.1	2	2.7
310	1. 0	1 5	18	3. 1	2.6	3 /
1078	1. 0	1 3	19	4 1	2.0	2.4
1353	1. 9	0 7	16	4. 1	2 0	34

实验条件同图 4(The conditions are the same as in Fig.4)。 ① 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net 效率。 tITP-CGE分析中, 因为样品预浓缩过程会占用一定通道长度, 留给 CGE的分离距离缩短。因 此, tITP-CGE获得的分离度与标准 CGE 相比有所下降。 FstITP-CGE分析中样品在进入 CGE分离时已 经被压缩成狭窄区带,其分离度与标准 CGE 相当 (表 2)。

本实验结果显示,相比较于筛分介质条件,自由溶液中瞬间等速电泳具有更好的预浓缩和分离效 果。预浓缩效果的改善主要是由于自由溶液条件下样品离子较高迁移速度引起的瞬间等速电泳时间延 长和瞬间等速电泳形成的压缩样品区带在自由溶液 筛分介质界面的二次富集所致。

References

- 1 WANG Hua(汪骅), WANG HuiMin(王惠民), JANG Qing Hui(金庆辉), CONG Hui(丛辉), SUN Cheng-Long(孙承龙), ZHOU Jin Hong(周锦红), WANG DatXin(王大新). Chinese J. Anal Chem. (分析化学), 2008, 36(11): 1531~1534
- 2 X iong Y, Park S R, Swerdlow H. Anal Chem., 1998, 70(17): 3605~3611
- 3 Beckmann A, Gebhardt F, Brandt BH. J. Chromatogr. B, 1998, 710(1-2): 75~80
- 4 Wainright A, Nguyen U T, Bjornson T, Boone T D. Electrophoresis 2003, 24(21): 3784~3792
- 5 Liu D, ShiM, Huang H, Long Z, Zhou X, Q in J, L in B J. Chromatogr B, 2006 844(1): 32~38
- 6 R iaz A, Chung D S Electrophoresis, 2005, 26(3): 668~673
- 7 Jeong Y, ChoiK, Kang M K, Chun K, Chung D S. Sensors and Actuators B, 2005, 104(2): 269~275
- 8 Liu D, O u Z, X u M, W ang L J. Chromatogr A, 2008, 1214(1-2): 165~170
- 9 Xu Z, E sum i T, Ikuta N, H irokawa T J. Chron atogr A, 2009, 1216(17): 3602~3605
- 10 Boden J. Bächmann K. J. Chromatogr. A, 1996, 734(2): 319~330
- 11 Van der schans M J Beckers JL, Molling M C, Evements F M. J. Chronatogr. A, 1995, 717(1-2): 139~147
- 12 QiLY, YinXF, LiuJH. J. Chromatogr. A, 2009, 1216(20): 4510~4516
- 13 W ang L, L iu D, Chen H, Zhou X. Electrophoresis, 2008, 29(24): 4976~4983
- 14 Liu D, Wang L, Zhong R, Li B, YeN, Liu X, Lin B J. Biotechnol, 2007, 131(3): 286~292
- 15 H jertén S. J. Chromatogr., 1985, 347: 191~198
- 16 Tseng W L, Chang H T. Anal Chem., 2000, 72(20): 4805~4811

Comparison of On-chip Transient Isotachophoresis Deoxyribonucleic A cid Preconcentration in Free-solution and G el Buffer

LIU DarYu, LIANG Guang-Tie, LEIX iu-Xia, ZHOU Xiao-Mian*

(Laboratory of Clinical Chenical Technology, Department of Laboratory Medicine,

Guangzhou First Municipal People's Hospital, Affiliated Hospital of Guangzhou Medical College, Guangzhou 510180)

Abstract Transient isotachophoresis (tITP) is a simplified ITP scheme for preconcentration and separation of DNA samples The tITP preconcentration is determined by tITP time that depends on the mobility difference of the terminating ions and the sample ions as well as of the terminating ions and the leading ions. The performances of on-chip tITP DNA preconcentration in free-solution and gel buffer were studied by investigating analytical data from tITP and capillary sieving electrophoresis (CGE) coupled analysis with laser-induced fluorescence detection. The results indicated that tITP in free-solution gave higher preconcentration and separation efficiency compared to that in gel buffer. The results were explained by the theory that the higher electrophoretic mobility in free-solution resulted to increased ITP time and therefore highly efficient tITP preconcentration. In addition, a further stacking at the interface between free-solution and gel also contributed to the improvement of preconcentration effects.

Keywords M icrofluidic electrophoresis; Isotachophoresis; Sample preconcentration; Deoxyribonucleic acid (Received 7 July 2009; accepted 24 O ctober 2009)