

微流控芯片电泳电导检测分离分析尿蛋白

马亮波^{1, 2, 3} 徐溢^{*1, 2, 3} 梁静¹ 刘海涛^{2, 3} 甘俊¹

李栋顺^{1, 2} 彭金兰^{1, 2} 吴珊¹

(重庆大学化学化工学院¹, 新型微纳器件与系统技术国防重点学科实验室²,
微纳系统及新材料技术国际研发中心³, 重庆大学, 重庆 400030)

摘要 基于自行构建的微流控芯片电泳集成非接触式电导检测分析系统, 建立了一种集进样、分离与检测为一体的微流控芯片电泳电导检测蛋白质的方法, 并用于人白蛋白(HSA)和人转铁蛋白(TRF)两种尿蛋白的分离分析以及肾病综合症病人尿液中白蛋白的定量检测。考察并优化了缓冲液、分离电压、进样方式、进样时间等电泳分离的影响因素, 在缓冲液为 pH=10 的 10 mmol/L 硼砂溶液, 电进样场强为 300 V/cm, 进样时间 10 s, 分离电压为 600 V 的实验条件下, 10 min 内完成了 HSA 和 TRF 的分离检测, 分离度为 2.0; 检出限分别为 0.4 和 0.8 g/L(S/N=3), 在 1~5 g/L 线性范围内相关系数分别为 0.9478 和 0.9491。实验中肾病综合症病人尿样中 HSA 的加标回收率为 95.4%~104.1%。

关键词 微流控芯片; 集成电导检测; 尿蛋白; 电泳分离

1 引言

尿蛋白是肾脏疾病及糖尿病诊断的重要指标之一, 而尿中蛋白的检测也是尿液化学成分分析最重要的项目之一。目前, 临床尿蛋白的检测方法主要有免疫法, 凝胶电泳法、试纸法和磺柳酸法。免疫法由于大多采用荧光或发光方法检测, 需对样品进行衍生化处理, 诊断试剂盒昂贵; 而临床常用的凝胶电泳法需要对样本进行染色等, 其检测过程复杂, 试剂要求较高, 耗时长; 试纸法和磺柳酸法都是根据浊度反应判断蛋白质为阴性或阳性的, 操作简便, 但是只能作为定性或半定量的依据, 并不能对尿液中的蛋白质进行定量研究。毛细管电泳技术相对于其它常规凝胶电泳技术, 具有自动化程度高, 试样用量少的优点, 在蛋白质分析方面得到了广泛应用^[1, 2]。而近年来以毛细管电泳技术为基础, 依托于微电子机械系统(Microelectromechanical systems, MEMS)的微流控芯片电泳技术由于具有微型化、快速、高效、高通量、样品用量少和易于集成化等特点, 在蛋白质的分离分析中得以广泛应用。微流控芯片上蛋白质的检测方法主要有光学检测法和电化学检测法。Mazurzy 等^[3]利用离子交换技术在聚二甲基硅氧烷(PDMS)材质的芯片上集成电子波导作为激发光源, 实现了蛋白质的荧光检测。黄淮清等^[4]采用十二烷基硫酸钠无胶筛分电泳模式-激光诱导荧光检测, 在玻璃芯片上完成了 6 种蛋白质的分离检测, 并通过这种方式测定了抗体免疫球蛋白 G 不同片段的分子量。Tanyanyiwa 等^[5]采用电容耦合非接触式电导检测在毛细管、玻璃芯片及聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)芯片上电泳分离的人免疫球蛋白 IgG 和 IgM。这些研究显示微流控芯片分析技术用于蛋白质分析的可行性及其对蛋白质组研究的极大促进作用。然而微流控芯片电泳技术由于检测技术的不完善在实际临床蛋白样本的应用研究还比较少。

本研究以人白蛋白(Human serum albumin, HSA)和人转铁蛋白(Human transferrin, TRF)两种尿蛋白为分析对象, 自行构建了一套集进样、分离与检测为一体的微流控芯片电泳电导检测分析系统, 通过对电泳分离影响因素进行优化, 考察蛋白质浓度与电导响应信号的定量关系, 建立了微流控芯片电泳电导检测人白蛋白和人转铁蛋白两种尿蛋白的新方法, 并应用于肾病综合症病人尿液蛋白样本的分析。

2010-11-30 收稿; 2011-03-03 接受

本文系国家自然科学基金(No. 20675089)、全国博士学位论文作者专项资金(No. FSNEDD-200941)、重庆市科技攻关项目(CSTC, No. 2010AC5050)、重庆大学研究生科技创新基金(No. CDJXS10-22-11-39)和中央高校基本科研业务费(No. CDJXS1-22-00-05)资助项目

* E-mail: xuyibbd@sina.com

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

玻璃-PDMS 复合电泳芯片(自行设计,中国电子科技集团第 24 研究所和第 44 研究所加工制作);集成电导检测信号采集系统(自行设计并制作);XCDY 型微流控芯片多路智能高压电源(0~8000 V/500 μ A,山东省化工研究院仪表研究所);XSP-BM 型显微镜(Nikon 公司);KQ-50E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);TG328B 型光电分析天平(上海精密仪器仪表公司)等。

HSA(分子量 66478 Da, pI 4.7,), TRF(分子量 77000Da, pI 5.9)购自美国 Sigma 公司;其余试剂均为分析纯。

缓冲溶液配制:准确称取 0.3814 g 硼砂,加 50 mL 蒸馏水超声溶解,用 NaOH 溶液将其调至 pH 10.0,定容至 100 mL。

蛋白质标准溶液配制:分别准确称取 HSA 和 TRF 标准品各 0.075 g,用配制好的硼砂缓冲液溶解,定容至 25 mL,分别配制成 5.0 g/L 的 HSA、TRF 的单标溶液和混合标准溶液,稀释备用。

尿液样本制备^[6]:取正常人晨尿 5 mL 及重庆新桥医院肾病综合症患者的晨尿 5 mL(医院磺柳酸定性结果为“+++”),以 1500 r/min 离心 5 min,用配制好的硼砂缓冲液稀释备用。

2.2 微流控芯片集成非接触式电导检测及其分析系统

依据本课题组研制的集成电导微电极的玻璃-PDMS 复合电泳芯片结构,自行设计制作出相应的外围电导检测电路,构建了集成化和微型化的分析系统。芯片的基片是石英玻璃材料,通过在其上溅射得到金微电极,依据非接触式电导检测器绝缘性要求,覆盖 SiO_2 绝缘层;采用 SU-8 阳膜(大连化物所制作),通过原位浇注 PDMS 成型法,制作成含有十字电泳分离管道的盖片。盖片与基片在常温下键合,形成集成底部电导检测微电极的玻璃-PDMS 复合电泳芯片(图 1A)。芯片的进样管道(bc)长 6.0 mm,分离管道(ad)长 3.0 cm,宽 80 μ m,深 15 μ m;电导检测电极(图 1B)集成在玻璃基片上分离管道的末端,并分别置于分离管道的两侧,一个为电导检测激励电极,另一个为电导检测输出电极。通过 ANSYS 软件对电导检测电极产生的电场强度进行模拟分析,初步确定检测电极的参数,并结合 OrCAD 软件对激发频率与输出电流之间的关系模拟分析,对初步设计的电导检测器的结构参数作进一步论证^[7],最终得到电导检测电极长 550 μ m,宽 40 μ m,厚度为 0.1 μ m,两电极间距 20 μ m; SiO_2 绝缘层厚度为 1 μ m,电导检测的激发频率为 450 kHz,激发电压为 10 V^[8]。

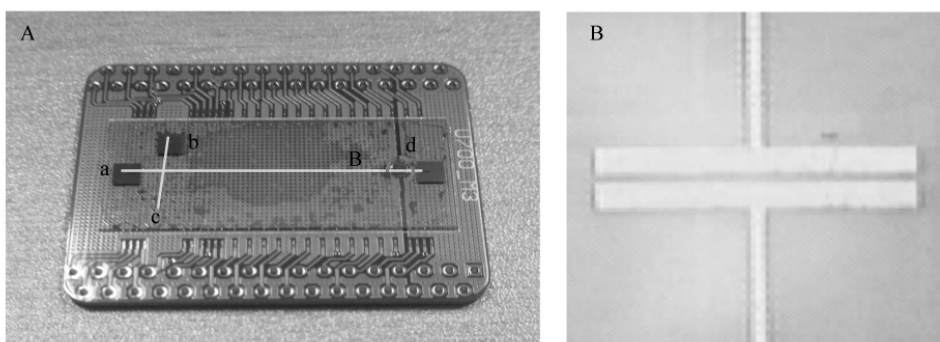


图 1 含集成非接触式二电极电导检测电泳芯片图

Fig.1 Electrophoresis microchip with integrated contactless conductivity microelectrodes

A, B 分别为集成非接触式二电极电导检测电泳芯片和电导检测电极;a, b, c, d 分别为缓冲液储液池、样品废液池、样品池、缓冲液废液池(A, B was photograph of the electrophoresis microchip integrated of two-electrode contactless conductivity detection, Photograph of the conductivity detecting electrodes; a, b, c, d was buffer reservoir, sample waste reservoir, buffer reservoir, sample waste reservoir)。

2.3 人白蛋白和人转铁蛋白的芯片电泳分离分析

在玻璃-PDMS 复合芯片上, 以 HSA 和 TRF 的标准品、添加了 HSA、TRF 的正常人尿液和肾病综合症病人尿液为测试对象, 采用芯片自由区带电泳分离模式, 自行构建了电泳芯片集成非接触式电导检测系统, 通过对电泳过程的缓冲液、进样方式、分离电压等影响因素的优化, 对其进行芯片电泳分离和电导检测。

在玻璃-PDMS 复合电泳芯片上, 以浓度为 1, 2, 3, 4 和 5 g/L 的 HSA 和 TRF 单标准溶液为电泳对象, 进行芯片电泳电导检测实验, 绘制标准曲线。

以正常人尿液和重庆新桥医院肾病综合症病人尿液样本为分析对象, 用自行构建的含集成非接触式电导检测电极的电泳芯片对其进行检测。

3 结果与讨论

3.1 集成非接触式电导检测微流控芯片分析系统

本研究所采用的微流控芯片电泳电导检测分析系统在前期研究中已对 K^+ 和氨基酸显示出高效的分离与检测性能^[8]。本实验将铂丝电极插入分离管道两头的储液池, 通过外接高压直流电源施加电泳过程的驱动和分离电压, 以实现整个分离检测过程。电泳分离管道尾端的集成非接触式电导检测电极可在线获取分离通道中组分电导信息, 通过外接管脚与外围自制的电导检测电路相连^[9], 电导检测电路与 A/D 信号采集电路相连接, 并将编辑好的电导信号采集程序下载到采集电路的程序控制主芯片上, 通过串口与 PC 机连接而实现对系统运行的程序控制和信号获取。集成非接触式电导检测电极与管道内溶液被绝缘层隔开, 可以有效避免电极与溶液直接接触, 防止污染电极, 降低了背景噪音, 提高了系统检测灵敏度。

3.2 人白蛋白和人转铁蛋白的芯片电泳分离条件优化

3.2.1 缓冲液的选择 MES/His 溶液和硼砂溶液是两种较常用的缓冲能力强、缓冲性能稳定的电泳缓冲溶液, MES/His 溶液作为两性电解质, 具有离子强度大、电导背景低的特点, 在电导检测中应用较多, 但从蛋白质电泳分离的实验结果来看, 其分离效率低于硼砂溶液。硼砂溶液具有缓冲能力较大、背景的电导信号高的特点, 而蛋白质具有相对较低的电导信号, 可以在保证电泳分离效果的同时, 通过两者的电导信号差值来实现蛋白质的芯片电导检测。

芯片电泳过程中, 缓冲液的浓度及 pH 值也是关键因素。因为缓冲液浓度过大会引起较强的焦耳热, 导致芯片微管道中产生气泡, 对电泳分离过程不利; 浓度过小, 其缓冲容量有限。HSA 和 TRF 的等电点分别为 4.7 和 5.9, 实验采用极端 pH 法, 选用 pH 10 的硼砂缓冲液, 因为碱性缓冲不仅能获得较大的电渗流, 还能抑制蛋白质在管壁表面的吸附, 提高分析效率。因此, 本实验采用 pH=10 的 10 mmol/L 硼砂溶液作为尿蛋白的芯片电泳分离的缓冲体系。

3.2.2 进样方式和进样时间的优化 负压进样和简单电进样均易于实施, 实验发现负压进样由于操作时间长以及操作的不稳定性, 造成峰展宽, 分离度下降, 影响到数据的稳定性和重现性, 而且分离效果不及电进样方式。

简单电进样时组分虽有歧视现象, 但其效果并不明显。当简单电进样时间过短, 样品组分可能还未或刚到达十字进样口, 此时样品区带就没有代表性。进样时间过长, 造成样品的扩散, 进样时间越长, 这种扩散作用就越明显。通过比较出峰时间、分离度和峰形变化, 选择简单电进样方式, 场强 300 V/cm, 进样时间为 10 s。

3.2.3 分离电压的优化 理论上讲, 分离电压对分离度和迁移时间均会产生显著影响, 在一定条件下提高分离电压有助于提高分离效果。但电压过高会带来基线波动较大、焦耳热增加等问题, 导致分离度下降。分别采用 300, 600 和 900 V 分离电压(场强分别为 100, 200 和 300 V/cm)进行平行实验, 考察分离电压对实验结果的影响(图 2)。对 HSA 和 TRF 标准品进行芯片电泳分离分析时, 分离电压为 900 V 时分离效果最好; 对肾病综合症病人尿液实际样本分析时, 当分离电压为 900 V, 基线不平稳, 波动较大, 焦耳热增加, 造成气泡现象严重, 导致分离过程无法持续进行; 分离电压降至 600 V 时, 出峰时间有所延迟, 但分离度较好, 基线平稳, 图谱清晰; 而分离电压由 600 V 降为 300 V 时, 出

峰时间进一步延迟,且蛋白质峰展宽比较严重。综合考虑分析时间以及分离效果,最佳分离电压选定 600 V。

3.3 人白蛋白和人转铁蛋白的芯片电泳分离分析

基于上述芯片电泳分离操作条件的实验优化结果,在后续实验中选用 pH=10 的 10 mmol/L 硼砂溶液为缓冲体系,电进样时间控制为 10 s,电泳分离电压选为 600 V,进行 HSA 和 TRF 的芯片电泳分离分析。

3.3.1 人白蛋白和人转铁蛋白标品的微流控芯片集成非接触式电导检测 在玻璃-PDMS 复合电泳芯片上,以 5 g/L 的 HSA 和 TRF 混合标准溶液为分析对象,进行芯片电泳电导检测实验,得到芯片电泳分离图谱(图 3)。平行测定 6 次,峰形重现良好,TRF 的出峰时间为 5.8 min, HSA 的出峰时间为 8.0 min,两

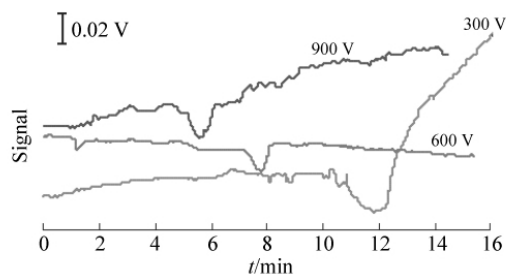


图 2 电压对肾病综合症病人尿液分离的影响

Fig. 2 Effect of voltage on separating urine sample from nephrotic syndrome patients on CE chip

种蛋白出峰时间的 RSD 分别为 4.2% 和 7.5%。两种蛋白分离度达到了 2.0, 实现了完全分离。向正常人尿液中,添加 5 g/L 的 HSA 和 TRF 标准溶液进行实验。采用与标准品相同的电泳条件,其电泳图谱中两种蛋白的出峰时间与标准品的出峰时间基本一致,也实现了完全分离。由于实际尿液样本中含有各种杂质,电泳图谱基线波动较大,但各杂质含量很低,并未出现明显的杂质峰。

3.3.2 线性区间和检出限 在玻璃-PDMS 复合电泳芯片上,分别以浓度为 1, 2, 3, 4 和 5 g/L 的 HSA 和 TRF 单标准溶液为电泳对象,进行芯片电泳电导检测实验,以峰面积作为定量依据,绘制标准曲线;将 1 g/L HSA 和 TRF 标准样品逐步稀释,当信噪比为 3 时,即得到两种蛋白质的检出限(S/N=3),结果见表 1。

3.3.3 微流控芯片集成非接触式电导检测分离分析肾病综合症病人尿液样本 临床检验规定:尿蛋白浓度为 0.1~0.5 g/L 为“+”, 0.5~2.0 g/L 为“++”, 2.0~5.0 g/L 为“+++”。实验所取样本为医院磺柳酸性结果为“+++”的肾病综合症病人尿液样本。当采用病人尿液直接上样电泳分离测试时,尿液中杂质易导致基线不稳,并且尿液中其它蛋白的电泳峰也比较明显,对测试有一定的干扰,因此,实验中将病人尿液稀释 3 倍进行检测,检测典型图谱如图 4。图中 8 min 附近出现了一个明显的 HSA 的电泳峰,6 min 出现了

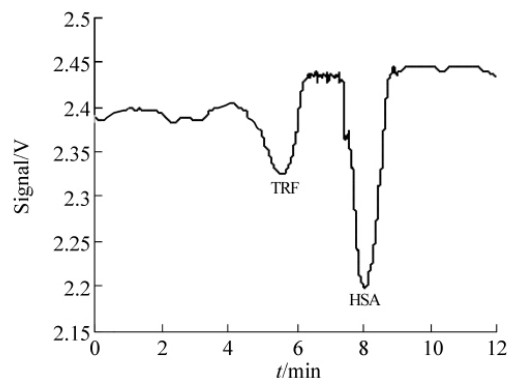


图 3 芯片电泳电导检测 5 g/L 的人白蛋白和人转铁蛋白混合样品电泳分离图谱

Fig. 3 Electrophoretogram of 5 g/L HSA and human transferrin (TRF) with homemade integrated conductivity detector on electrophoresis microchip

表 1 HSA 和 TRF 标准单样品线性回归方程及检出限
Table 1 Linear regression equation and detection limit

样品 Sample	线性回归方程 Equation of linear regression	相关系数 (r)	线性范围 Linear range (g/L)	检出限 LOD (S/N=3) (g/L)
HSA	$y=0.058x-0.0694$	0.9478	1~5	0.4
TRF	$y=0.0792x-0.0189$	0.9491	1~5	0.8

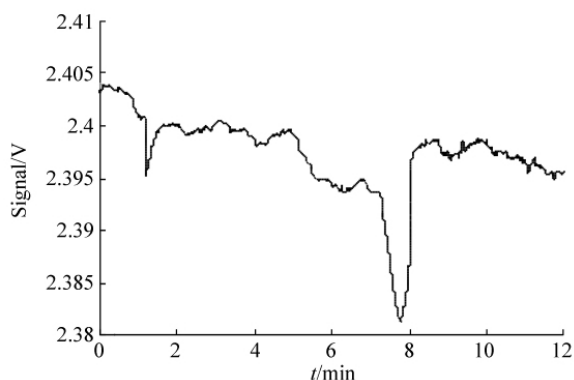


图 4 肾病综合症病人尿液样本的芯片电泳电导检测典型图谱

Fig. 4 Electrophoretogram of HSA and TRF in urine sample of nephrotic syndrome patient with integrated conductivity detector on CE microchip

TRF 的峰,但是两种蛋白的分离效果不理想。另外在 1.3 min 处还出现了一个比较明显的峰,估计为尿液中其它蛋白质的电泳峰。

肾病综合症病人典型的病理现象是尿液中出现大量蛋白质,主要是 HSA。而 TRF 在尿液中含量很低,检测图谱中峰形较小,难以对其进行准确定量检测,所以,样本测试主要针对 HSA 进行定量测试。根据表 1 中 HSA 的线性回归方程及 3 倍稀释病人尿液系列样本的芯片电泳电导检测图谱,可计算得到 HSA 的浓度,进而得到尿液中的 HSA 含量值;进而,在正常人尿液和 HSA 浓度为 1.40 g/L 的稀释 3 倍的肾病综合症病人尿液中(稀释后磺柳酸定性结果为“++”),分别添加 HSA 标准样品,进行加标回收实验。实验结果见表 2。

表 2 HSA 试样加标回收实验结果

Table 2 Detection results of HSA by homemade microsystem

样本 Sample	初始值 Original (g/L)	添加 Added (mg)	测得值 Found (g/L)	RSD (%)	回收率 Recovery (%)	磺柳酸法 Sulfosalicylic acid test
正常尿液 Normal urine	1	<0.4	0	/	/	-
	2	<0.4	1.0	1.03	/	+
	3	<0.4	1.5	1.46	/	++
	4	<0.4	2.0	2.08	/	++
病人尿液 Patient urine	1	1.40	0	1.36	/	++
	2	1.40	0	1.39	3.27	++
	3	1.40	0	1.45	/	++
	4	1.40	0.5	1.93	/	+++
	5	1.40	1.0	2.29	/	+++
	6	1.40	1.5	3.02	/	+++

注(Note): “+” 0.1~0.5 g/L; “++” 0.5~2.0 g/L; “+++” 2.0~5.0 g/L; “-” 未检出(Not detected)。

磺柳酸法是根据浊度反应将无混浊或无沉淀定为阴性(-),将出现混浊或沉淀的定为阳性(+),所测结果为尿液中总蛋白的浓度,它只是定性和半定量的检测模式。由表 2 可见,芯片测试相关结果与医院现行的磺柳酸法检测结果对照,显示出良好的符合性。而本实验提出的微分析系统可实现对尿中白蛋白的定量测试。

4 结 论

采用自行研制的集成非接触式电导微电极的微流控电泳芯片分析系统,以尿液中的标志性蛋白 HSA 为分析对象,建立了一种集进样、分离与检测为一体的微流控芯片电泳电导检测的蛋白质分析检测的新方法。本方法在 10 min 内可完成两种尿蛋白的分离检测,1~5 g/L 的线性范围内测试绘制了 HSA 和 TRF 标准单样品的标准曲线,相关系数分别为 0.9478 和 0.9491,检出限分别为 0.4 和 0.8 g/L。正常人尿样和肾病综合症病人尿样中 HSA 的加标回收率分别为 97.3%~104.0%和 95.4%~104.1%。本方法分析快速、试剂消耗量少、操作简单,可用于肾病综合症患者尿液中白蛋白的定量分析。对于微流控分析系统在医疗、临床、环境、食品、安全卫生等领域的应用奠定了基础。

References

- Wittke S, Fliser D, Haubitz M, Bartel S, Krebs R, Hausadel F, Hillmann M, Golovko I, Koester P, Haller H, Kaiser T, Mischak H, Weissinger E M. *J. Chromatogr. A*, **2003**, 1013(1-2): 173~181
- LIU He-Chun, YANG Chun, YANG Qing, ZHANG Wei-Bing, ZHANG Yu-Kui(刘和春, 杨春, 杨青, 张维冰, 张玉奎). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2004**, 32(3): 273~277
- Mazurczyk R, Vieillard J, Bouchard A, Hannes B, Krawczyk S. *Sensors and Actuators B*, **2006**, 118(1-2): 11~19
- HUANG Huai-Qing, DAI Zhong-Peng, QIN Jian-Hua, LIN Bing-Cheng(黄淮青, 戴忠鹏, 秦建华, 林炳承). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2008**, 36(6): 719~723
- Tanyanyiwa J, Hauser P C. *Anal. Chem.*, **2002**, 74(24): 6378~6382
- SHEN Xia, ZHANG Min-Hua, WANG Ping, TAO Mei-Hua(沈霞, 张敏华, 汪萍, 陶美华). *Chin. J. Lab Med.*

