



# 微芯片电泳-紫外检测系统分析蛋白质\*

刘菁<sup>1)</sup> 庄贵生<sup>1)</sup> 徐良基<sup>1)</sup> 贾春平<sup>1)</sup> 金庆辉<sup>1)</sup> 赵建龙<sup>1,2)</sup>\*\*

<sup>1)</sup>中国科学院上海微系统与信息技术研究所, 上海 200050;

<sup>2)</sup>生物芯片上海国家工程研究中心, 上海 201203)

**摘要** 微芯片电泳是基于微机电加工技术 (MEMS) 工艺, 在芯片上的微管道中完成电泳检测过程的新型技术。依据紫外吸光度分析法, 对蛋白质样品进行电泳分离与紫外检测。实验采用自控接口模板对进样及分离电压进行了系统的程序化控制, 从而准确地控制整个电泳、检测流程, 提高了微芯片电泳的分离效率和检测灵敏度。实验结果表明, 夹流进样的方法可以有效分离混合蛋白, 可用于蛋白质样品的分离检测。

**关键词** 微芯片电泳, 紫外检测, 蛋白质

**学科分类号** O652.6

微芯片电泳技术是将传统毛细管电泳 (CE) 技术与微机电加工技术 (MEMS) 相结合的一种分离分析技术。它以刻蚀在芯片上的纤细管道为分离通道, 以高压直流电场为驱动力, 是毛细管电泳技术的重大技术延伸。它不但继承了传统毛细管电泳技术中 nl 水平检测及可分离分析大分子样品 (如蛋白质) 的优势, 还发挥了微系统体积小、检测效率高、时间短、耐用性好、成本低廉、可以在一块微芯片上实现多路并行检测等优势<sup>[1]</sup>。

进样电压的控制的微芯片电泳的过程中有着极其重要的作用。微芯片上毛细管的分离通道短, 进样速度和进样样品带长度会对分离效率等重要的分析性能产生很大的影响。精确控制进样-分离电压模式可以有效提高样品的分离效率与检测灵敏度, 是微芯片电泳的关键技术。本文介绍的微型紫外蛋白检测系统, 以近年来迅速兴起的微芯片电泳技术为理论基础和分析方法, 通过工控装置程序化控制微芯片电泳的实验过程, 改善了微芯片电泳分离效率也实现了检测仪器的小型化。

## 1 实验部分

### 1.1 实验装置

根据紫外吸光度分析法<sup>[2]</sup>检测蛋白质, 装置由光源/光路系统、信号接收和处理系统、仪器自动控制等部分构成。紫外氙灯 (190 ~ 600 nm) 作为光源, 以带通滤光片和单色光镜 (分光光度计) 选择吸收波长。利用两套透镜系统, 将光源的出射

光汇聚到微芯片的管道上, 在光电倍增管 (PMT) 前汇聚经样品吸收后的光信号, 提高检测灵敏度。以 PMT 检测光信号, 并进行光电信号的转换。PMT 输出为 0 ~ 10 V 电压值, 经 10 Hz 二阶巴特沃斯低通滤波器滤掉工频后, 利用 PC-6315 系列数据采集卡 (北京中泰研创科技有限公司) 采集。系统控制界面采用 VB 编辑, 以中泰工控的控制设施实现仪器的自动化控制。控制信号分为数字和模拟两部分, 数字输出幅值为 3.7 V 经反向器调整其高低电平状态后用以控制直流 5 V 继电器, 继电器用以切换、控制直流高压模块及 PMT 的工作状态; 范围为 0 ~ 5 V 的模拟输出, 经 OP-27 型运放调整幅值后与 PMT 及高压模块的 CON 端口相联, 控制高压模块输出幅值及 PMT 的工作状态。

### 1.2 微芯片的制作

采用石英玻璃制作毛细管电泳芯片, 散热快, 可承受的分离电压高, 缩短分离时间并提高分离效率。且石英玻璃材料有较小的紫外吸收, 便于利用紫外蛋白吸光度分析法来检测各类蛋白质。以石英玻璃 (40 mm × 70 mm × 4 mm, 已镀好铬层) 为基片材料, 制作十字、双 T 型管道。管道及缓冲液池 (B), 样品池 (S), 废液池 (W), 样品废液池 (SW) 分布, 如图 1 所示。

\* 国家高技术“863”计划项目 (2002AA2Z2021)。

\*\* 通讯联系人。

Tel: 021-62511070-8702, Fax: 021-62511070-8714

E-mail: jlzhao@mail.sim.ac.cn

收稿日期: 2004-06-15, 接受日期: 2004-07-30

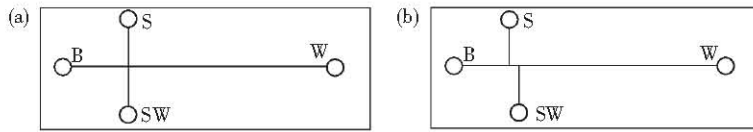


Fig. 1 Schematic form of cross channel (a) and double-T channel (b)

The sectional dimensions of the micro-channel are  $30.0\ \mu\text{m} \times 70.0\ \mu\text{m}$  and each reservoir's volume is  $20\ \mu\text{l}$ .

The respective reservoir's name is buffer (B), sample (S), waste (W), sample waste (SW).

微芯片的制作流程<sup>[3]</sup>如图 2 所示, 将镀好铬的石英玻璃基片光刻显影后, 用 HF 腐蚀得到十字/双 T 型管道深  $30 \sim 50\ \mu\text{m}$ , 宽  $70\ \mu\text{m}$ , 进样管道长  $30\ \text{mm}$ 、

分离管道  $50\ \text{mm}$ ; 在管道端部打孔 (直径为  $3\ \text{mm}$ ) 做微池, 以铬腐蚀液去铬; 将反复清洗的玻璃基片与玻璃盖片紧密贴合, 放入真空干燥箱键合。

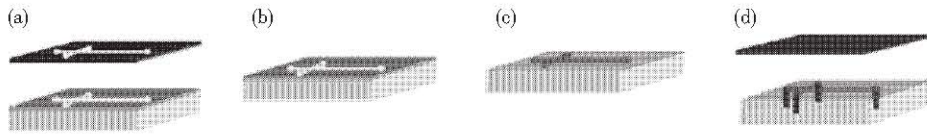


Fig. 2 Fabrication of glass-based microchip

(a) Lithography, (b) Glass etching, (c) Photoresist removing, (d) Holes drilling and bonding.

### 1.3 试剂与样品

牛血清白蛋白 (BSA)、转铁蛋白 (transferrin)、 $\alpha$ 1-抗胰蛋白酶 ( $\alpha$ -antitrypsin)、免疫球蛋白 (IgG) 等均从 Sigma 公司订购, 实验采用  $75\ \text{mmol/L}$  pH 10.0 的硼砂为缓冲液。

### 1.4 实验过程

微芯片样品池中注入样品, 样品废液池、缓冲液池、废液池均注入 pH 值为 10.0 的硼砂缓冲液。铂金电极性质稳定, 插入 4 个微池, 用来施加电压。进样阶段样品将在电压的作用下从样品池流向样品废液池; 转入分离模式后, 处在十字交叉口的样品被推入分离管道, 经检测窗口流向废液池。不同的蛋白质将在电渗的作用下在分离管道内发生分离。以 PMT 检测被样品吸收后的光信号, 显示并分析经滤波采集后的信号, 可根据光吸收情况确定蛋白质的种类及含量。

## 2 理论模型

电渗流是微流控芯片分析系统中使用最广的驱动和控制技术<sup>[4]</sup>。基于双电层原理, 微芯片电泳通过改变微池端口所加电压来控制电渗流的流向和流量, 对通道网络中液流进行自动化的控制操作。采用的十字/双 T 型管道均可视为 4 条通道的交叉电路网络, 在此基础上建立电压调控电渗流的电路模型, 如图 3 所示。

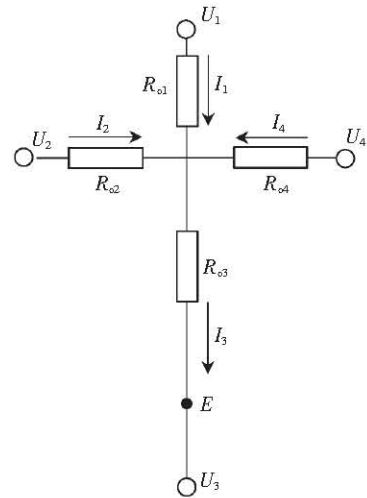


Fig. 3 Schematic circuit diagram of the channel

The channels connected to the high-voltage can be transformed into a circuit model, and the PMT is aimed at  $E$  point.

微芯片充满硼砂缓冲液的状态下, 利用  $V-I$  曲线粗略测量 4 个端口之间管道的总电阻值 (即测出  $R_{12}$ ,  $R_{13}$ ,  $R_{14}$ ,  $R_{23}$ ,  $R_{24}$ ,  $R_{34}$ )。以交叉点  $O$  为电阻分隔点解联立的方程组, 计算出  $R_{o1}$ ,  $R_{o2}$ ,  $R_{o3}$ ,  $R_{o4}$ 。利用基而霍夫定律, 建立如 (1) ~ (5) 的电路方程组, 在  $U_1/U_2/U_3/U_4$  已定的条件下, 可以求出各直管道及交叉点电位  $U_o$ , 判断各点样品所受电场力。电渗作用下, 流体的流动总是随着电场力变化, 通过调节施加于各储液池的外加

电压 ( $U_1, U_2, U_3, U_4$ ) 可以调控各通道中液流的方向和速度, 从而达到汇流、分流、稀释、进样等流动分析中必不可少的基本单元操作.

$$I_1 = \frac{U_1 - U_0}{R_{o1}} \quad (1)$$

$$I_2 = \frac{U_2 - U_0}{R_{o2}} \quad (2)$$

$$I_4 = \frac{U_4 - U_0}{R_{o4}} \quad (3)$$

$$I_3 = \frac{U_0 - U_3}{R_{o3}} \quad (4)$$

$$I_3 = I_1 + I_2 + I_4 \quad (5)$$

### 3 结果与讨论

加电压方式是蛋白质紫外吸收光度检测实验中的重要参数, 决定着微芯片电泳的分离效率. 夹流进样的方式<sup>[5]</sup>, 在进样时施加压缩样品的偏压以减小样品条带宽度; 分离样品过程中偏压将进样管

道内样品清空以去除样品拖尾, 清空的进样管道可以反复进样. 在提高分离度和实验重复性的基础上, 蛋白质紫外吸收光度检测系统可以有效地分离和检测混合蛋白.

#### 3.1 夹流进样对检测峰型的影响

实验过程分为进样和分离两步. 普通进样方式, 进样时电压施加在样品池和样品废液池之间, 在电渗流的作用下, 样品从样品池流向样品废液池, 将交叉口处的一小段通道中充满样品, 后将电压切换到缓冲液池和废液池之间, 储存在交叉口的一段样品被推入到分离管道, 在分离管道内的压力梯度下进行分离. 其中双 T 型管道的进样量 (图 4b) 微大于十字型管道 (图 4a), 注入分离管道的样品量并没有受到通道体积所限定, 而是由于分子扩散作用以及在交叉口弯曲电力线作用, 向缓冲液通道 (缓冲液池与交叉口之间) 和分离通道扩张 (废液池与交叉口之间).

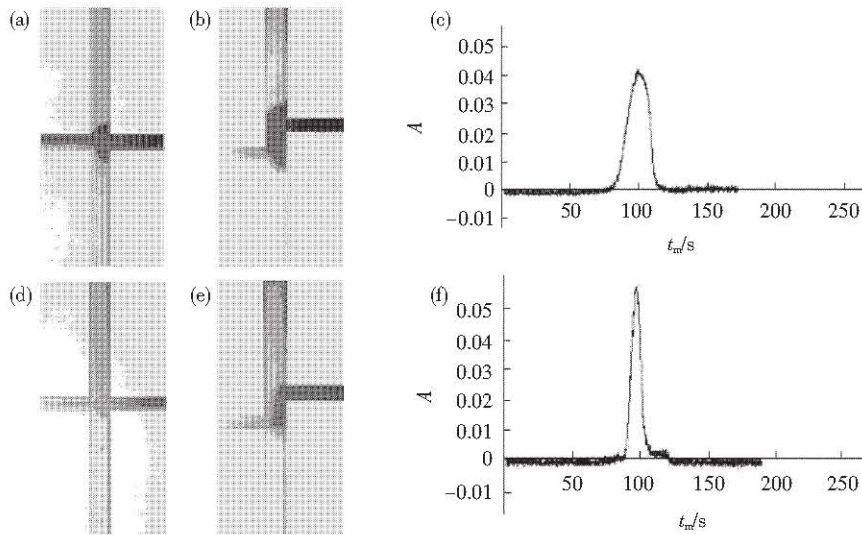


Fig. 4 Comparison of detection results with different injection mode

(a), (b) are the photos and (c) is the UV-absorption ( $A$ ) result of the simplest injection. (d), (e), (f) are UV-absorption result of the pinched injection. All the photos are the taken by Olympus microscope system and the bromophenol blue are observed with boric acid buffer at pH 10.0. With the same boric acid buffer, the UV-absorption method is used to detect albumin.

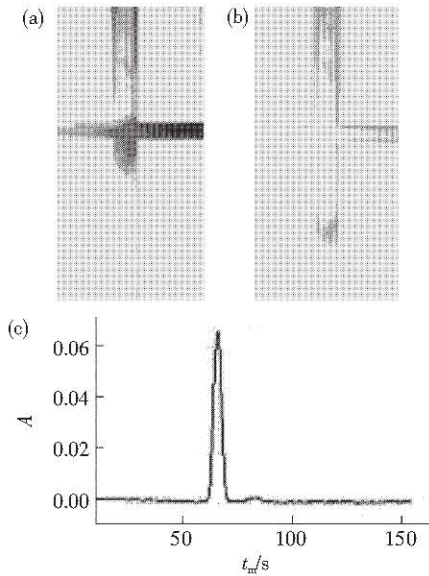
试验中采用了夹流进样的方法, 对进样阶段这种谱带扩展现象加以抑制, 如图 4d 和 e. 即在  $U_4$  加 500 V<sup>[6]</sup> 左右直流高压、 $U_2$  接地的同时, 给  $U_1$  及  $U_3$  端口加上 400 V 以下的电压. 其具体电压值由管道网络的电阻值决定, 并根据公式 (1) ~ (5) 方程组计算而得. 所加偏压的配比定要根据公式仔细计算, 据此分析交叉口样品所受电场力的作用方向. 加压不妥会造成进样扩散, 达不到加偏

压的效果; 或者阻止进样, 错误偏压值将造成样品的不流动, 滞留在进样管道 (样品池与交叉口) 之间, 无法进入到交叉口. 需保证  $U_1, U_3, U_4$  大于交叉口电压  $U_0$  的值, 而  $U_0$  的值大于  $U_2$  的值, 计算方法可参见方程组. 实验中在充分依据电路原理进行电压选择的同时, 采用数控设备 (中泰工控 PC6315) 的模拟输出来精确控制高压模块的输出, 根据实验精确调节加压幅值及加压方式. 采用

压缩进样后样品检测峰型有了明显的改善, 如图 4c 和 f 所示. 样品带展宽的减小, 锐化了蛋白质样品的吸收光度检测峰型, 保证了微芯片毛细管电泳的高分离效率.

### 3.2 分离阶段偏压模式及重复进样

分离阶段在进样管道施加偏压的方法避免了被测样品的拖尾, 提高了分辨率; 进样管道内的样品清空后, 可以进行电压切换进行新一轮的进样-分离, 重复检测过程. 进样与分离阶段转换瞬间, 如图 5a 所示样品由缓冲液推入分离管道进入分离



**Fig. 5 The repeatable separation process**

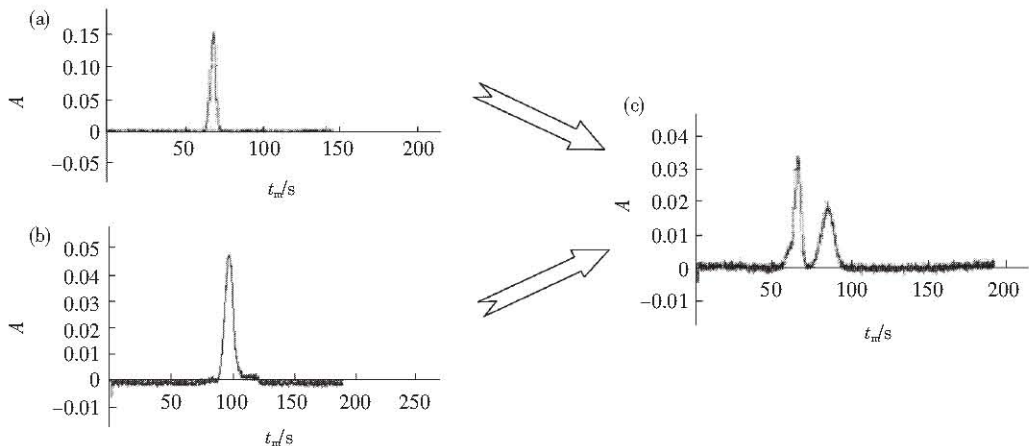
(a) is the moment that the injection is switched to the separation phase and the injection channel is full of sample. (b) is the separation phase and the sample in the injection channel is cleared. (c) is the sharp detected peak of the albumin.

阶段. 采用偏压分离的方式, 在  $U_1$  大于  $U_0$ ,  $U_2$ 、 $U_3$ 、 $U_4$  小于  $U_0$  的条件下, 将进样阶段后充溢在交叉口的样品试样以三角形状态向下推入到分离管道, 且同时将交叉口两侧残留的样品分别推向样品池和样品废液池, 清空了进样及进样废液管道中样品, 如图 5b 所示. 进样管道偏压, 可避免分离阶段样品因拖带作用进入分离通道形成背景信号, 从而可得到“尖锐”的蛋白质检测峰型结果, 如图 5c 所示.

在微芯片毛细管电泳检测过程中, 消耗 nl 级样品的程序化操作是完全可行的. 利用软件控制界面编辑进样分离的程序, 通过 PC6315 的数字输出信号控制继电器进行电压模式的切换, 操作灵活准确. 实验中可根据检测要求进行进样-分离程序的编辑, 自由控制加压幅值及进样次数; 可实现同一样品的重复检测, 不但可以完成分离场强梯度实验, 还节省了实验间进行芯片重新处理 (注入缓冲液、样品等) 的步骤, 避免了操作误差. 实验中的多次进样可能会造成缓冲液的离子浓度降低, 从而电渗电流下降, 管道中的液流速度将逐渐降低直到静止, 因此要根据进样、分离阶段电流情况进行实验的操作, 当电流过小时将不必再进行进一步的检测实验.

### 3.3 标准样品检测结果

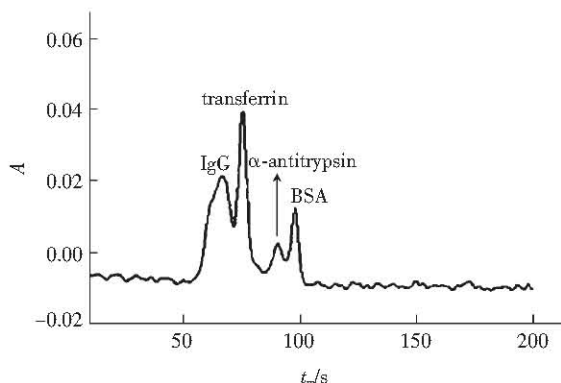
利用 PMT 采集样品吸收后的光信号, 并将其转化为吸收光度进行显示. 图 6a 和 b 为对单一标准蛋白的检测结果, 图 6c 为混合样品. 不同蛋白质的迁移速度不同, 蛋白质检测峰的出峰时间是判断蛋白质的种类及性质的依据.



**Fig. 6 The separation and detection of the protein**

The peak is the result that detected by the UV-absorption method. (a) is the transferrin. (b) is the albumin. (c) is the separation result of the transferrin and albumin.

同时, 还对 4 种混合蛋白质样品进行了检测, 结果如图 7 所示, 证明了此种检测方法可以有效分离蛋白质样品, 用于对不同种类的蛋白质检测且有着一定的区分度。



**Fig. 7 The separation result of four mixed protein**

The sample contained IgG, transferrin,  $\alpha$ -antitrypsin, BSA. The buffer is boric acid at pH 10.0.

实验中灵敏度的提高一直是工作的重心, 进样量的减少 (即减小样品带宽度), 对检测装置灵敏度提出挑战。从光路的改进入手, 对透镜等光学器件进行改装及调整, 以增加 PMT 对有效检测信号的吸收, 滤掉并屏蔽杂散光以提高信噪比; 对芯片结构进行改进, 缩小分离管道宽度及加大管道长度都将加大管道电路网络电阻值, 减缓样品分离速度, 可以提高分离效率。

## 4 小 结

采用自动化的检测控制装置, 利用微芯片毛细管电泳对蛋白质样品进行检测。分析了检测装置的原理及组成, 验证了微芯片毛细管电泳的整个历程, 并就进样-分离阶段的电压模式进行了讨论, 这是提高检测灵敏度、分离度的有效手段。实验结果证明, 微芯片毛细管电泳的分析方法可以有效地分离蛋白质, 紫外吸收光度分析法可以达到检测灵敏度, 可作为一种新型、有效的蛋白质检测手段。且其具有检测快速, 所需样品量少等微系统优点, 具有一定的市场前景和研究意义。

## 参 考 文 献

- 1 Verpoorte E. Microfluidic chips for clinical and forensic analysis. *Electrophoresis*, 2002, **23** (5): 677 ~ 712
- 2 周名成, 俞汝勤. 紫外与可见分光光度分析法. 北京: 化学工业出版社, 1986. 13 ~ 31
- 3 Zhou M C, Yu R Q. UV-Vis Absorption Spectroscopy. Beijing: Chemical Industry Press, 1986. 13 ~ 31
- 4 Fu L M, Lin C H. Numerical analysis and experimental estimation of a low-leakage injection technique for capillary electrophoresis. *Anal Chem*, 2003, **75** (21): 5790 ~ 5796
- 5 Harrison D J, Manz A, Fan Z, *et al.* Capillary electrophoresis and sample injection systems integrated on a planar glass chip. *Anal Chem*, 1992, **64** (17): 1926 ~ 1932
- 6 Zhang C X, Manz A. Narrow sample channel injectors for capillary electrophoresis on microchips. *Anal Chem*, 2001, **73** (11): 2656 ~ 2662
- 7 Fan Z H, Harrison D J. Micromachining of capillary electrophoresis injectors and separators on glass chips and evaluation of flow at capillary intersections. *Anal Chem*, 1994, **66** (1): 177 ~ 184

## A Microchip Electrophoresis System With UV Detection for Protein Analysis\*

LIU Jing<sup>1)</sup>, ZHUANG Gui-Sheng<sup>1)</sup>, XU Liang-Ji<sup>1)</sup>, JIA Chun-Ping<sup>1)</sup>, JIN Qing-Hui<sup>1)</sup>, ZHAO Jian-Long<sup>1,2)</sup>\*\*

<sup>1)</sup> Shanghai Institute of Microsystem and Information Technology, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200050, China;

<sup>2)</sup> National Engineering Research Center For Shanghai Biochip Technology, Shanghai 201203, China)

**Abstract** The electrophoretic microchip fabricated by MEMS technology is successfully used to finish the electrophoresis process. The albumen-detected technology is based on the UV-absorption principle. The utilization of the procedural control makes the experimental process convenient and exact, and therefore improves the separation efficiency and detection sensitivity. It is proved that the pinched injection can separate the mixed proteins efficiently in this on-chip capillary.

**Key words** microchip electrophoresis, UV detection, protein

\* This work was supported by a grant from State 863 High Technology R&D Project of China (2002AA2Z2021).

\*\* Corresponding author. Tel: 86-21-62511070-8702, Fax: 86-21-62511070-8714, E-mail: jlzhao@mail.sim.ac.cn

Received: June 15, 2004 Accepted: July 30, 2004