

芯片毛细管电泳检测痕量酶活性的初步探讨*

丛 辉¹⁾ 王惠民^{1)**} 鞠少卿¹⁾ 金庆辉²⁾ 贾春平²⁾ 宋宏伟¹⁾

(¹⁾南通大学附属医院医学检验中心, 南通 226001; ²⁾中国科学院上海微系统与信息技术研究所, 上海 200050)

摘要 微芯片技术是基于微机电加工技术(MEMS)工艺, 在芯片上完成电泳检测过程的新型技术. 利用自制的微流控芯片及激光诱导荧光系统建立了痕量乳酸脱氢酶(LDH)活性的检测方法. 以 pH 9.4, 75 mmol/L 硼酸为芯片电泳缓冲液, 9.73 $\mu\text{mol/L}$ 乳酸钙为添加剂, 整个电泳过程 4 min 结束, 利用该法测得 LDH 检测限($S/N=3$)为 6×10^{-3} U/L, 出峰时间和峰面积的相对标准偏差分别为 5.32% 和 3.17%, 该法操作过程简单, 检测灵敏度高, 在临床痕量酶检测中具有较好的应用前景.

关键词 芯片毛细管电泳, 氧化型辅酶 I, 还原型辅酶 I, 乳酸脱氢酶

学科分类号 R446, R446.1

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00605

微流控芯片(microfluidic chip)技术自 20 世纪问世以来, 为化学检测提供了一种新的技术平台, 最完善的芯片实验室(Lab-on-a-chip)可以集预处理、分离、稀释、混合、化学反应、检测及提取于一体^[1]. 由于其具有常规毛细管电泳及普通电泳所无法比拟的优势, 如良好的散热性、可以外加比常规毛细管电泳更高的电场、驱动样品快速进样和分离、分析时间短、分析效率高、试剂和样本消耗量少、可以进行多种现场分析等, 其在临床中的应用日趋广泛, 包括检测 DNA^[2,3]、氨基酸^[4,5]、蛋白质^[6,7]等.

酶是由活细胞合成的对特异性底物起高效催化作用的蛋白质. 人体内酶活性的高低通常可反应人体的健康状况和疾病的发展趋势, 尽早发现人体内酶活性的变化对临床诊断、治疗及预后判断十分重要. 在人体体液如脑脊液中许多酶的含量很低, 临床常规方法不能检测其浓度, 本研究尝试着用微流控荧光检测技术构建乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)痕量检测的方法, 取得初步成功.

1 实验部分

1.1 试剂

1.1.1 电泳缓冲液. 75 mmol/L 硼酸(AR, 江苏太仓二厂)缓冲液 pH 9.4(23℃)含 9.73 $\mu\text{mol/L}$ 乳酸钙.

1.1.2 反应基质液. 二氨基二甲基 1,3 丙二醇缓冲液 pH 9.4(23℃)含 50 mmol/L 二氨基二甲基 1,3 丙二醇(AM₂P, Sigma 公司 A-9754)、20 mmol/L 氧化型辅酶 I (NAD⁺)(Sigma 公司 N-0632)、51.6 mmol/L 乳酸锂(lithium L-lactate, Sigma 公司 L-2250). 需要注意的是, NAD⁺在碱性条件下易变性, 应在开始电泳之前才可将 NAD⁺加入反应基质液中.

1.1.3 其他试剂. NADH (Sigma 公司 N-8129), NAD 钠盐(Sigma 公司 N-0632), LD1 纯品(Sigma 公司 L-0377), 水为二次石英亚沸蒸馏水. 所有试剂配制完毕均用 0.2 μm 滤膜过滤.

1.2 仪器

1.2.1 自制微流控芯片. 在 5 cm×5 cm×0.1 cm 石英玻片上, 利用照相平板湿蚀刻法^[8], 刻制了如图 1 的芯片通道, 芯片管道直径为 80 μm , 约 40 μm 深, B、BW、S、SW 贮液端直径 1 mm, 深度 200 μm , S、SW 端接加样电极, 加样泳道长 2 cm, B、BW 端接分离电极, 分离泳道长 5 cm(泳道未行修饰, 进样及电泳驱动力以电渗为主). 见图 1.

* 国家高技术研究发展计划(863)资助项目(2003AA404200).

** 通讯联系人.

Tel: 0513-85052102, E-mail: ntfjyjk@pub.nt.jsinfo.net

收稿日期: 2008-09-01, 接受日期: 2008-10-30

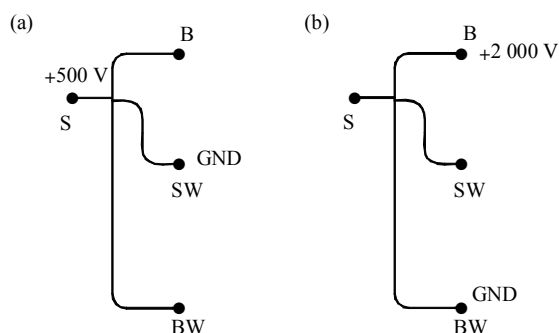


Fig. 1 The channels of microfluidic chip

(a) Injection. (b) Separation. S: Sample reservoir, B: Buffer reservoir, SW: Sample waste reservoir, BW: Buffer waste reservoir, GND: Ground.

1.2.2 荧光检测系统. 光源部分采用功率较大的氙灯, 光谱范围 200~900 nm, 光学元件包括 360nm 滤光片、半反半透二向镜、透镜和光电倍增管等原件组成. 在信号处理时电路中采用滤波和放大处

理, 使进入 PC 的信号信噪比尽量提高. 经过光电倍增管(photomultiplier tube, PMT)转换后的模拟信号首先通过 10 Hz 二阶巴特沃斯低通滤波器进行滤波处理, 再经低噪声放大器进行前级放大, 信号的幅度大大提高, 同时低频噪声也相应地被放大, 再经低通滤波器进行滤波处理后, 进行二级放大, 最后将信号滤波送至 A/D 采集电路转换为数字信号, 见图 2. 仪器的自动控制包括电源控制和光电倍增管控制, 电源控制选用继电器实现微流控芯片各个液池中所加电极的电压控制, 按照设定值和次序导通或切断电源. 实现样品的进样和分离, 利用计算机送出的高、低频控制继电器的工作状态, 实现进样和分离两种模式的自动切换. 电泳所需电压由两个低压控制高压的电源模块组成, 分别为 0~1 000 V(控制电压 0~5 V)和 0~5 000 V(控制电压 0~5 V).

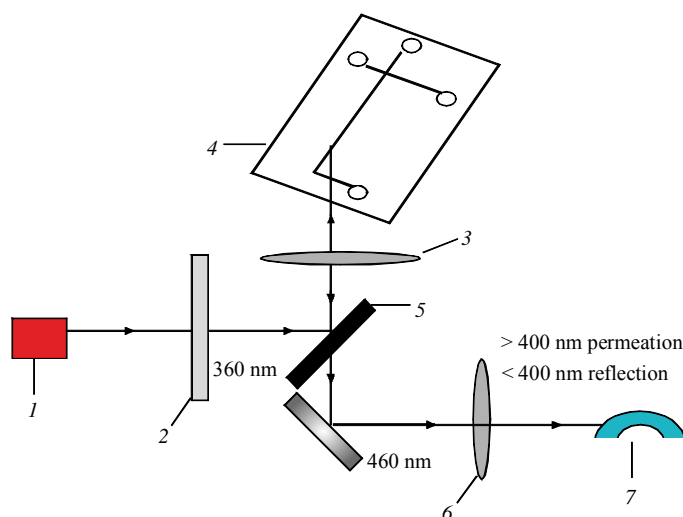


Fig. 2 Schematic diagram of the fluorescent spectrophotometer

1: Xe lamp; 2: Bandpass filter; 3: Lens 1; 4: Microchip; 5: OF1; 6: Lens 2; 7: PMT.

1.2.3 pHs-3TC 酸度计(上海天达仪器有限公司), 全自动生化分析仪 HITACHI-7600-020(日立公司).

1.3 标本采集

清晨取卧位测试对象全血标本 3 ml, 3 000 r/min 离心 10 min, 轻取上层血清 2 份, 1 份全自动生化分析仪进行 LDH 浓度测定, 另一份用双蒸水 20 倍稀释, 作为电泳待测标本.

1.4 芯片处理

实验前、后与每次标本检测间隔芯片泳道和储液池均用 1 mol/L NaOH 冲洗 3 遍、去离子水冲洗 3 遍、缓冲液冲洗 3 遍, 抽干, 缓冲液于泳道中浸泡 2 min(1 min/遍), 抽干.

1.5 电泳过程

电泳进样分离模式如图 1 所示. 进样时, 样品池加+500 V, 进样 20 s, 样品废液池接地, 缓冲液池和缓冲液废液池悬空, 37℃ 孵育; 分离时, 缓冲液池加+2 000 V, 缓冲液废液池接地, 样品池和样品废液池悬空. 检测窗口设在芯片分离通道距废液池约 5 mm 处.

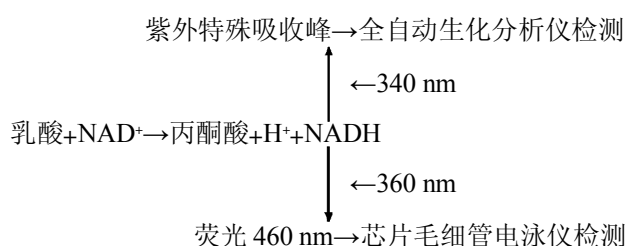
1.6 电泳原理

石英玻璃微通道表面因硅羟基解离会产生负电荷, 其结果是产生指向负极的电渗流. 管道中蛋白酶分子及 NADH 的迁移速度是外加电场、溶剂阻力与电渗流作用的结果. 由于电渗流的作用通常大

于带电粒子所受电场力作用, 所以样品粒子在管道进行与电渗流方向一致的差速迁移. 通过末端检测器的检测并记录得到电泳图谱.

1.7 实验原理

微流控芯片电泳仪和全自动生化分析仪检测 LDH 酶的原理如下所示. NADH 在 340 nm 时有特殊吸收峰, 而在 360 nm 波长下, 可激发出 460 nm 荧光.



1.8 实验方法

分别将 pH 9.4 的 75 mmol/L 硼酸缓冲液、AM₂P 反应基质液、NAD⁺以及 NADH 作为样本分别进行电泳荧光检测, 在进样时间为 20 s, 进样电压为 500 V, 分离电压为 2 000 V 的条件下, 整个电泳过程 3 min 结束. 实验时对缓冲液进行了选择, 尝试用 NaHCO₃/Na₂CO₃ 作为缓冲液对 LDH 纯品进行了电泳测试. 将 1 份临床血清样品(全自动生化分析仪测得 LDH 浓度为 142 U/L)稀释 20 倍进行电泳, 将 LDH 纯品进行逐步稀释法, 进行方法的线性范围和检测限的测试, 并配制一份 LDH 纯品浓度为 8 U/L 的标准品连续平行操作 5 次, 测定其重复性.

2 实验结果

从电泳荧光检测发现, 除 NADH 在 110 s 左右出现一荧光峰, 见图 3, pH 9.4 的 75 mmol/L 硼酸缓冲液、AM₂P 反应基质液、NAD⁺均无特异性峰出现, 峰型锐利, 基线平整. 用 NaHCO₃/Na₂CO₃ 缓冲液代替硼酸缓冲液电泳分离 LDH 纯品, 结果见图 4. 一份临床血清样品电泳图谱见图 5, 出峰时间在 140 s 左右, 比 LDH 标准品出峰时间略有延迟. 以 LDH 浓度为横坐标(x), LDH 峰面积为纵坐标(y), 进行直线回归, 求得的直线回归方程即为标准工作曲线, 线性回归方程为 $y = 1.3819x - 1.0955$, $r = 0.9127$. 经过逐步稀释法测得 LDH 纯品检测限为 6×10^{-3} U/L($S/N=3$). 浓度为 8 U/L LDH 纯品经过连续平行操作 5 次, 其出峰时间和峰面积相对标准偏差分别为 5.32%和 3.17%.

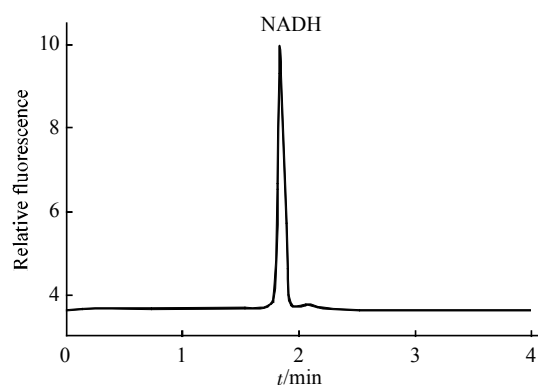


Fig. 3 Graph of electrophoresis of NADH

Electrophoresis buffer: 75 mmol/L borate containing 9.73 μ mol/L calcium lactate(pH 9.4); Electrophoresis condition: injection (20 s, 500 V) was followed by the separation(3 min, 2 000 V); sample: 0.352 mmol/L NADH.

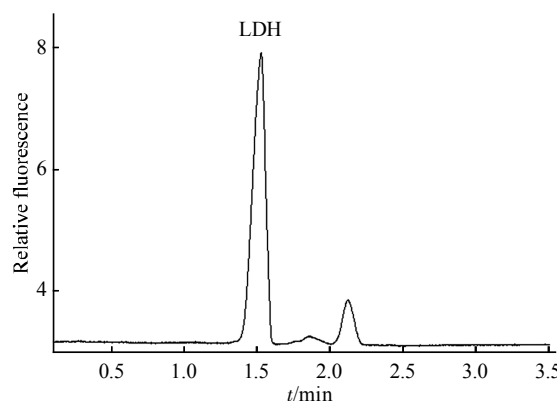


Fig. 4 Graph of electrophoresis of LDH

Electrophoresis buffer: 50 mmol/L NaHCO₃/Na₂CO₃ containing 9.73 μ mol/L calcium lactate(pH 9.0); Electrophoresis condition: injection (20 s, 500 V) was followed by the separation(3 min, 2 000 V); sample: 8 U/L purified LDH.

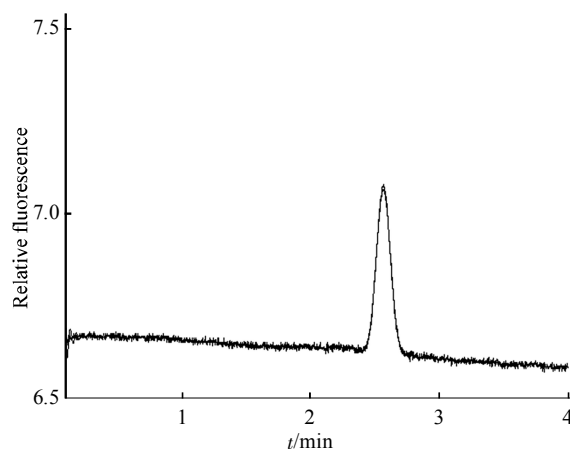


Fig. 5 Graph of electrophoresis of serum sample

Electrophoresis buffer: 75 mmol/L borate containing 9.73 μ mol/L calcium lactate(pH 9.4); Electrophoresis condition: injection (20 s, 500 V) was followed by the separation(3 min, 2 000 V); sample: 7.01 U/L serum sample.

3 讨 论

20 世纪末, 许多研究者利用半导体光刻微加工技术, 在芯片上实现了样品的电泳分离, 称为微分析技术或微流控分析技术. 该技术集中了色谱与毛细管电泳技术的众多优势, 快速简便、试剂等消耗几乎可以忽略不计, 应用范围日趋广泛, 已成为目前生命科学中的研究热点. 但国际上将该技术用于蛋白质的分析尚处于研究阶段, 特别是将该技术用于酶的分析鲜见报道.

酶是由活细胞合成的对其特异底物起高效催化作用的蛋白质, 在病理和生理的状态下, 起着十分重要的作用. 在临床医学中, 检测 LDH 酶可用于许多疾病的诊断, 如检测脑脊液中的 LDH 用于中枢神经系统(central nervous system, CNS)感染性质的鉴别、脑血管病的鉴别、良恶性肿瘤以及白血病的辅助诊断. 尿液中的 LDH 活性可用于肾炎、肾衰以及泌尿系肿瘤的鉴别诊断, 连续监测尿 LDH 活性还可作为诊断肾脏病和判断预后的指标等. 但是脑脊液和尿液等体液中 LDH 含量甚微, 仅为血清中的 1/10~1/40, 常规检测方法由于受检测灵敏度的限制, 对脑脊液和尿液中 LDH 酶的含量一直不能很好地进行检测.

本研究主要是以微流控芯片电泳技术为平台, 构建检测痕量 LDH 酶的方法. 研究中首先优化了实验条件. 在极端 pH 时有利于电渗流, 但同时极端 pH 使 LDH 酶活性减低, 经实验证实 pH 9.4 为最适. 酶反应的孵育温度有文献报道为 24℃, 酶在 37℃ 的活性约为 24℃ 时的 2 倍左右, 而 42℃ 时虽酶反应速度更快, 但会产生更高的焦耳热, 降低分离效率, 且荧光量子产率随温度升高而降低, 在实验中我们设定孵育时温度为 37℃, 其余温度控制在 15℃, 达到满意效果. 底物浓度的选择也是酶反应的关键, 为充分发挥酶的活性, 一般底物浓度选择于 10 倍 K_m 值, $K_{\text{乳酸}}=(5.16\pm 1.21)$ mmol/L, 因此本文选择乳酸锂的最适浓度为 51.6 mmol/L. 理论上 NAD^+ 最适浓度的期望值在 5 mmol/L, 但由于 NAD^+ 在极端 pH 条件下极不稳定, 而且反应中形成了酶-NADH-乳酸和酶-NAD-丙酮酸两种不活泼的终端复合体, 以致 NAD^+ 达到饱和浓度时才能测得酶的最大活性, 故最终选择 NAD^+ 浓度为 20 mmol/L.

另外, 我们在考察缓冲液时选用了 $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ 作为反应基质液代替 AM_2P , 以

LDH 纯品为测试样本进行电泳, 以及用 NAD^+ 钠盐代替 NAD^+ 直接进行电泳分离发现, 除了特异性的 NADH 峰外, 还有其他较小峰出现, 考虑可能为其他物质如 Na^+ 在激发波长($\lambda_{\text{ex}}=360$ nm), 发射波长($\lambda_{\text{em}}=460$ nm)时出现的荧光(有待于进一步的研究), 见图 3. 因此, 我们认为 AM_2P 缓冲液更适合利用乳酸脱氢酶反应体系来进行 NAD^+ 的检测以及 NADH 的荧光分析.

实验中采用 NADH 的激发波长与文献报道 342 nm、382 nm 等^[8]均不太一致, 而发射波长 460 nm^[9], 基本一致, 原因可能与激发光源以及 NADH 的来源、纯度和加工过程、反应体系等有关; NAD^+ 在 360 nm 激发下在 460 nm 处无发射峰, 与有关资料一致^[10].

在对图 4、图 5 的对比中发现, 血清与 LDH 纯品产物 NADH 的出峰时间相差 1 min 左右, 因为血清中含有大量的蛋白质, 电泳时极端 pH 只能在一定程度上降低但不能完全消除蛋白质吸附造成的. 在实验时加入适当的介质, 当缓冲液中未加入乳酸钙时血清样品出峰时间比 LDH 纯品出峰时间延迟约 4 min, 但缓冲液中加入一定浓度的乳酸钙时, 两样品出峰时间接近程度有了很大改善. 在后续实验中, 我们将进行泳道内壁的修饰、对标本预处理, 最大限度地减少蛋白质的吸附, 提高结果的重复性和灵敏度.

综上所述, 本研究以微流控芯片技术为平台, pH 9.4, 75 mmol/L 硼酸为芯片电泳缓冲液, 9.73 $\mu\text{mol/L}$ 乳酸钙为添加剂构建了痕量 LDH 酶活性的检测方法, 整个电泳过程 4 min 结束, LDH 检测限达到 6×10^{-3} U/L, 达到痕量检测的目的, 比常规检测方法的灵敏度高出甚多(全自动生化分析仪的最低检测限为 12 U/L), 而且重复性较佳. 该方法的构建弥补了临床常规检测的不足, 满足了临床医学中酶痕量检测的需求, 具有较好的应用前景.

参 考 文 献

- 1 Harrison D J, Manz A, Fan Z H, *et al.* Capillary electrophoresis and sample injection systems integrated on a planar glass chip. *Anal Chem*, 1992, **64**(17): 1926~1932
- 2 Chiesl T N, Shi W, Barron A E. Poly(acrylamide-co-alkylacrylamides) for electrophoretic DNA purification in microchannels. *Anal Chem*, 2005, **77**(3): 772~779
- 3 Lin Y W, Huang M F, Chang H F. Nanostructures for capillary electrophoretic separations of DNA. *Electrophoresis*, 2005, **26**(2): 320~330
- 4 Skelley A M, Mathies R A. Chiral separation of fluorescamine-

- labeled amino acids using microfabricated capillary electrophoresis devices for extraterrestrial exploration. *J Chromatogr A*, 2003, **1021** (1~2): 191~199
- 5 Kato M, Gyoten Y, Sakai-kato K, *et al.* Rapid analysis of amino acids in Japanese green tea by microchip electrophoresis using plastic microchip and fluorescence detection. *J Chromatogr A*, 2003, **1013**(1~2): 183~189
- 6 Tsai S W, Loughran M, Suzuki H, *et al.* Native and sodium dodecyl sulfate-capillary gel electrophoresis of proteins on a single microchip. *Electrophoresis*, 2003, **25**(3): 494~501
- 7 Li Y, Buch J S, Rosenberger F, *et al.* Integration of isoelectric focusing with parallel sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis for multidimensional protein separations in a plastic microfluidic [correction of microfluidic] network. *Anal Chem*, 2004, **76** (3): 742~748
- 8 V.bmce Grossie, Jr John Yick. Glutamine stability in biological tissues evaluated by fluorometric. *Clin Chem*, 1993, **39**(6): 1059~1063
- 9 邵丽丽, 潘瑾, 肖洁. 还原型辅酶 I 荧光特性的初步观察. *临床检验杂志*, 2002, **20**(5): 287~288
- Shao L L, Pan J, Xiao J. *Chin J Clinical Laboratory Sci*, 2002, **20**(5): 287~288
- 10 康格非, 巫向前. *临床生物化学和生物化学检验*. 第 2 版, 北京: 人民卫生出版社, 1998. 400
- Kang G F, Wu X Q. *Clinical Biochemistry and Biochemistry Test*. 2nd. Beijing: People's Medical Publishing House, 1998. 400

A Method to Measure Trace Enzyme Based on Microchip Capillary Electrophoresis*

CONG Hui¹⁾, WANG Hui-Min^{1)**}, JU Shao-Qing¹⁾, JIN Qing-Hui²⁾, JIA Chun-Ping²⁾, SONG Hong-Wei¹⁾

¹⁾ Laboratory Medicine Center, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, China;

²⁾ Shanghai Institute of Microsystem and Information Technology, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200050, China)

Abstract The microchip fabricated by MEMS technology is successfully used to finish the electrophoresis process. A novel electrophoresis analysis protocol of the trace enzyme of lactate dehydrogenase (LDH) on microfluidic chip platform is developed with a Xe lamp-induced fluorescence detection system. Satisfactory separation of LDH was achieved in 75 mmol/L borate buffer containing 9.73 $\mu\text{mol/L}$ calcium lactate as running buffer (pH 9.4) within 4 min. The detection of LDH limits ($S/N=3$) is 6×10^{-3} U/L. The coefficients of variation of peak time and areas were 5.32% and 3.17%. The method is easily operated. To application microfluidic chips with the method, the sensitive of detectable enzyme will be much more improved. The method for trace enzymes has potential for clinical application.

Key words microchip capillary electrophoresis, nicotinamide adenine dinucleotide(NAD⁺), reduced nicotinamide adenine dinucleotide(NADH), lactate dehydrogenase

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00605

*This work was supported by a grant from Hi-Tech Research and Development Program of China(2003AA404200).

**Corresponding author.

Tel: 86-513-85052102, E-mail: ntffyjk@pub.nt.jsinfo.net

Received: September 1, 2008 Accepted: October 30, 2008