

· 论 著 ·

聚二甲基硅氧烷微流控芯片电泳的临床应用研究*

汪 骅^{1△}, 韩崇旭¹, 王惠民², 金庆辉³, 王大新¹, 曹 丽¹, 董兰梅¹

(1. 扬州大学临床医学院, 江苏扬州 225001; 2. 南通大学附属医院, 江苏南通 226001;

3. 中国科学院上海微系统与信息技术研究所, 上海 200050)

摘要:目的 探讨聚二甲基硅氧烷(PDMS)微流控芯片电泳技术的临床应用价值。方法 利用模塑法制作 PDMS 微流控芯片,选择二胺基二苯甲烷(DDM)与羟丙基纤维素(HPC)对 PDMS 进行修饰,有效消除蛋白在芯片壁面上的吸附。PDMS 微流控芯片电泳分离 DNA 标准品、PCR 多重产物及血清脂蛋白。结果 10、20、50、100、200 bp 的 DNA 片段得到了很好的基线分离及良好重现性,峰面积的相对标准偏差分别为 4.8%、6.3%、5.9%、3.5%、3.4%。线粒体疾病患者的多重 PCR 产物片段 165、266、378、881 bp 在 4 min 内实现了基线分离。血清低密度脂蛋白亚型、小而密低密度脂蛋白(sdLDL)实现了快速检测,冠心病组血清 sdLDL 检出率与健康体检组差异有统计学意义($P < 0.01$)。结论 PDMS 微流控芯片电泳具有简单、快速、高效、低耗等特点,适合临床常规分析。

关键词: DNA; 脂蛋白; PDMS 微流控芯片

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.01.002

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)01-0004-03

Clinical application research of polydimethylsiloxane microchip electrophoresis*

Wang Hua^{1△}, Han Chongxu¹, Wang Huimin², Jin Qinghui³, Wang Daxin¹, Cao Li¹, Dong Lanmei¹

(1. Clinical Medical College of Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225001, China; 2. Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong, Jiangsu 226001, China; 3. Shanghai Institute of

Microsystem and Information Technology, Chinese Academy of Science, Shanghai 200050, China)

Abstract: Objective To explore the clinical application of polydimethylsiloxane(PDMS) microchip electrophoresis. **Methods** The PDMS microchip was produced by molding a PDMS silicone elastomer against a microfabricated maser. Hydroxypropylcellulose (HPC) and n-Dodecyl β -D-maltoside(DDM) were utilized to alter channel surface to make it become hydrophilic and nonionic, thus reducing the interaction between the protein and the surface. DNA markers, multi-PCR products, and serum lipoproteins were separated by PDMS microchip electrophoresis. **Results** The reproducibility of the detection system was evaluated by Sybr Green labeled DNA markers containing five fragments, and relative standard deviation(RSD) value of peak area to each corresponding fragment could reach 4.8%, 6.3%, 5.9%, 3.5% and 3.4% respectively. The multi-PCR products, including 165, 266, 378 and 881 bp fragments, could be successfully achieved baseline separation by this system within 4 min. The proportion of small, dense low density lipoprotein(sdLDL) were significantly higher in patients with coronary heart disease than in healthy controls($P < 0.01$). **Conclusion** PDMS microchip capillary electrophoresis could be a simple, rapid, effective and cost-low method, and could be a suitable analytical technique for clinical application.

Key words: DNA; lipoproteins; PDMS microchip

微流控芯片实验室是自 1990 年 Manz 等提出微全分析系统概念后发展起来的新兴学科。微流控芯片电泳是微全分析系统的一个重要组成部分,由于其具有分析速度快、可集成化、便于携带等优点^[1],已用于氨基酸^[2]、蛋白质^[3]、细胞^[4]等的检测和分析,在食品安全、新药筛选、环境监测、司法鉴定等领域逐步得到应用。本课题组利用自制石英微流控芯片对尿蛋白、脂蛋白进行了分析^[5-6]。由于石英微流控芯片加工困难、生产成本高、成品率低等特点限制了其在临床分析中的应用,选择加工成型方便、价格便宜、能大批量制作的一次性微流控芯片用于临床应用研究成为目前分析领域的热点。本文利用模塑法制作聚二甲基硅氧烷(PDMS)芯片,实现了核酸及血清脂蛋白的分离,初步探讨了 PDMS 微流控芯片电泳的临床应用价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集冠心病患者血清 52 例,均经冠状动脉造影证实有冠状动脉病变,线粒体疾病患者的多重 PCR 产物由中国科学院上海微系统与信息技术研究所提供;健康对照组 50 例(均排除心脑血管疾病),标本由扬州大学临床医学院提供。

1.2 仪器与试剂 微流控芯片电泳激光诱导荧光分析仪为自主研发^[7],采用 CX 系统电源(中科院上海应用物理研究所),可调输出电压为 0~5 000 V,见图 1、2。图 1 是本项目用于 DNA 和蛋白质分析整个微流控芯片的结构示意图,整个芯片的外围尺寸为 63.5 mm×31.7 mm,芯片上有 4 个储液池:样品池(S)、样本废液池(SW)、缓冲液池(B)、废液池(BW)。S-SW 段为样本充样微通道,B-BW 段为样本注样微通道。检测窗口设置在接近 BW 端储液池的管道弯道处。管道的设计尺

* 基金项目:江苏省社会发展基金资助项目(BE 2010679);扬州大学临床医学院基金资助项目(yzucms201041)。△ 通讯作者,E-mail: ntdx05yjswh@126.com。

寸设置为 30 μm ,直管道总长为 47 mm,分离管道的有效分离长度为 43.7 mm,芯片基片厚度为 2 mm,盖片厚度为 1 mm,芯片储液池设计为直径 2 mm.芯片制作主要分为以下几个步骤:用 SU-8(美国 Micro Chem 公司)常规光刻法制得具有凸形图案的模板;用 PDMS 预聚物再铸模;PDMS 固化成型后从模具上剥离并其他基片黏接闭合微管道.图 2 为转移复制后的 PDMS 基片十字交叉处的扫描电子显微镜观察到的结果.羟丙基纤维素(HPC,平均相对分子质量 100×10^3),二胺基二苯甲烷(DDM)购于美国 Sigma 公司,NBD C6-ceramide 购于美国 Molecular Probes 公司.

1.3 方法 电泳前,微通道用 0.01% DDM 处理 5 min 以提高微通道的亲水性,减少 PDMS 芯片对蛋白的吸附,之后将 3% HPC 和缓冲液加入到微通道,标记有荧光物质的样品加入到样品池.试样池施加电压,试样废液池接地,待测样品进入进样通道.当样品经过十字交叉口时,切换电压进入分离阶段.缓冲液池施加电压,缓冲液废液池接地,样品进入分离通道,在检测口被检测.

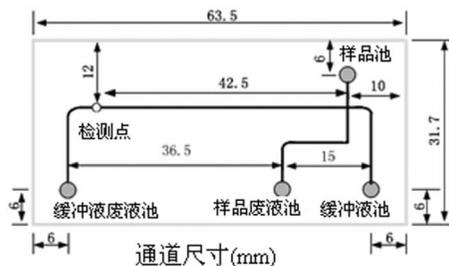


图 1 微流控芯片结构示意图

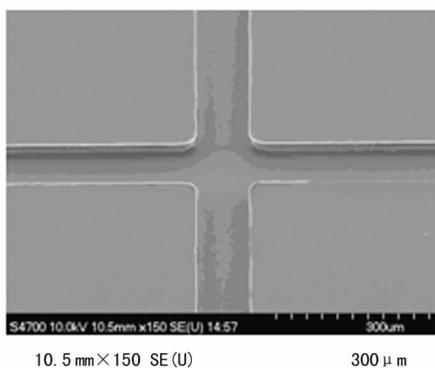


图 2 PDMS 基片十字交叉处扫描电子显微镜图

1.4 统计学处理 采用 χ^2 检验进行统计分析。

2 结果

2.1 利用 Sybr Green 标记的 10~200 bp 的 DNA Marker 检测 PDMS 芯片的分离能力,缓冲体系为 3% 羟丙基纤维素(HPC),进样电压为 800 V,进样时间为 30 s,分离电压为 1 000 V,连续进样 5 次的分离结果,见图 3. 10、20、50、100 和 200 bp 的 DNA 片段得到了很好的基线分离及良好重现性,峰面积的相对标准偏差分别为 4.8%、6.3%、5.9%、3.5% 和 3.4%。微流控芯片电泳结果与传统琼脂糖凝胶电泳结果一致。

2.2 利用 Sybr Green 标记的线粒体疾病患者的多重 PCR 产物检测 PDMS 芯片对实际样品的分离能力,缓冲体系为 3% 羟丙基纤维素(HPC),进样电压为 800 V,进样时间为 30 s,分离电压为 1 000 V,分离结果见图 4,产物片段 165、266、378、

881 bp 得到很好的基线分离。微流控芯片电泳结果与琼脂糖凝胶电泳结果一致。

2.3 PDMS 微流控芯片电泳分离 NBD. C6-ceramide 标记的血清脂蛋白,缓冲体系为 2% 羟丙基纤维素(HPC),进样电压为 700 V,进样时间为 40 s,分离电压为 3 000 V.分离结果见图 5,高密度脂蛋白(HDL)、低密度脂蛋白 A 型(LDL)与低密度脂蛋白 B 型(sdLDL,小而密低密度脂蛋白)实现了基线分离.选择冠心病患者和健康体检者血清进行电泳分析,50 例健康体检者中 4 例分离出 sdLDL 峰,检出率 8.0%,52 例冠心病患者血清样本中 37 例分离到 sdLDL 峰,检出率 71.2%,两组检出率比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。健康体检者与冠心病患者典型电泳图谱见图 5。

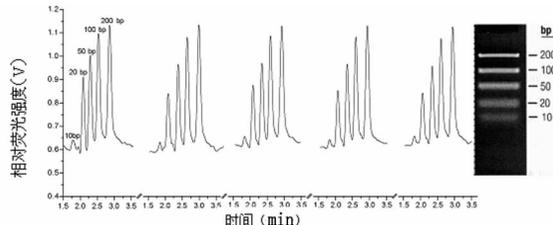


图 3 10~200 bp 的 DNA Marker 微流控芯片电泳分离峰(n=5)和琼脂糖凝胶电泳图谱

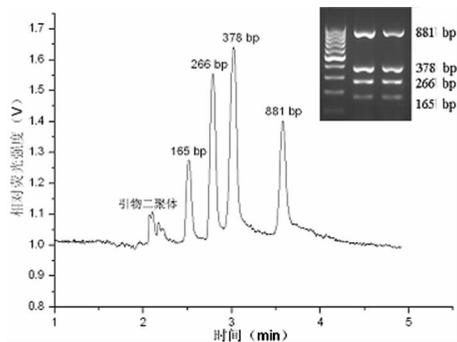
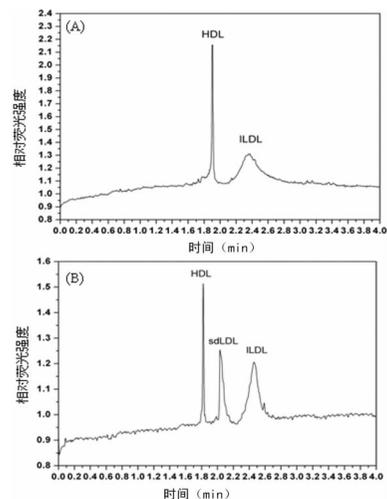


图 4 多重 PCR 产物(165、266、378、881 bp)微流控芯片电泳与琼脂糖凝胶电泳图谱



A: 健康对照;B: 冠心病患者。

图 5 血清微流控芯片电泳图谱

3 讨论

微芯片毛细管电泳系统是微全分析系统的一个重要组成

部分,以微机械电子系统技术为依托,在石英、玻璃、塑料等基片上刻蚀出微管道网络和其他的功能单元,形成进样、反应、分离、检测于一体的快速、高效、低耗的微型分析装置,使传统毛细管电泳分离物质的整个过程可以在一块几平方厘米的基片上得以实现。高分子材料具有种类多、可选择余地大、加工成型方便、加工便宜等优点,非常适合于大批量制作一次性微流控芯片。PDMS 具有能可逆和重复变形而不发生永久性破坏、可高保真、无毒、价廉等特点,已广泛地应用于制备微流控分析芯片^[8]。尽管 PDMS 具有以上特点,但其壁面具有很强疏水性,易使核酸、蛋白等物质强烈吸附^[9],不利于电泳分离。因此,研究一种简单的表面修饰方法,有效消除分析物质在 PDMS 壁面的吸附是本研究拟解决的关键问题。

本文选择 DDM 和 HPC 有效消除 PDMS 微通道上分析物质吸附和抑制电渗流。DDM 为非离子型表面活性剂,能吸附在疏水表面并形成单分子层^[10]。HPC 作为 PDMS 微流控芯片用于 DNA 片段电泳分离的筛分介质。不同浓度的 HPC 作为改性剂,HPC 是具有壁面吸附能力的亲水性高分子,当加入低浓度 HPC 时($\leq 0.75\%$),可有效地改变 PDMS 壁面的疏水性,使得电泳缓冲液更加容易灌入管道。当加入较高浓度 HPC($\geq 1.5\%$),HPC 分子链相互缠绕,使得电泳具有筛分的能力,可以应用于 DNA 片段的分离分析。如图 3、4 所示,PDMS 微流控芯片电泳分离 DNA 获得良好重现性,并可用于线粒体疾病患者 PCR 多重产物的检测。微流控芯片电泳的结果与传统琼脂糖凝胶电泳结果相一致,但此法比琼脂糖凝胶电泳操作简单、分析速度快,适合临床常规分析。

血清低密度脂蛋白(LDL)颗粒在大小、密度和脂质组成上具有异质性。根据颗粒相对大小,LDL 一般分为 A、B 两型,A 型为较大颗粒,是大而轻低密度脂蛋白(ILDL),颗粒较小的 B 型即小而密低密度脂蛋白(sdLDL),是动脉粥样硬化发生的危险因素,与冠心病的形成密切相关^[11-12]。近年来,sdLDL 与冠心病的关系越来越受到人们关注,但尚缺乏简易 LDL 亚组分分析的方法。李健斋和王抒^[13]提出以 ApoB 测定评估 sdLDL 水平的设想,建议 LDL-C 与 ApoB 同时测定并结合 TG 水平用于估计 LDL 亚组分的类型。如图 5 所示,本研究建立的方法可快速、简易地测定 sdLDL,冠心病组血清中 sdLDL 检出率与健康体检组差异有统计学意义($P < 0.01$)。结果显示,基于 PDMS 微流控芯片电泳的 sdLDL 分离分析,对评价冠心病的危险因素,实现对冠心病的早期检测、预防及有效制定冠心病防治策略具有重大意义。

PDMS 微流控芯片电泳对 DNA、脂蛋白表现出来的高分辨、高速的分离分析能力,使其最有希望攻克成为蛋白组学研

究、基因临床诊断、药物筛选等难题的分离分析手段之一。

参考文献

- [1] Harrison DJ, Manz A, Fan ZH, et al. Capillary electrophoresis and sample injection systems integrated on a planar glass chip[J]. Anal Chem, 1992, 64(2): 1926-1932.
- [2] 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]. J Chromatogr A, 2003, 1013(1/2): 183-189.
- [3] Li Y, Buch JS, Rosenberger F, et al. Integration of isoelectric focusing with parallel sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis for multidimensional protein separations in a plastic microfluidic network[J]. Anal Chem, 2004, 76(3): 742-748.
- [4] Munce NR, Li J, Herman PR, et al. Microfabricated system for parallel single-cell capillary electrophoresis[J]. Anal Chem, 2004, 76(17): 4983-4989.
- [5] 王惠民,孙承龙,王跃国,等. 微流控芯片电泳在快速分离尿蛋白中的临床应用价值[J]. 中华检验医学杂志, 2004, 27(9): 551-553.
- [6] Wang H, Wang HM, Jin QH, et al. Microchip-based small, dense low-density lipoproteins assay for coronary heart disease risk assessment [J]. Electrophoresis, 2008, 29(9): 1932-1941.
- [7] Chen JF, Jin QH, Zhao JL, et al. A signal process method for DNA segments separation in micro-channel electrophoresis[J]. Biosens Bioelectron, 2002, 17(6/7): 619-623.
- [8] Duffy DC, McDonald JC, Schueller OJA, et al. Rapid prototyping of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane) [J]. Anal Chem, 1998, 70(23): 4974-4984.
- [9] Linder V, Verpoorte E, Thormann W, et al. Surface biopassivation of replicated poly(dimethylsiloxane) microfluidic channels and application to heterogeneous immunoreaction with on-chip fluorescence detection[J]. Anal Chem, 2001, 73(17): 4181-4189.
- [10] Zhang L, Somasundaran P, Maltesh C. Adsorption of n-Dodecyl-beta-d-maltoside on solids [J]. J Colloid Interface Sci, 1997, 191(1): 202-208.
- [11] 鄒盛恺. 临床血脂测定与应用[J]. 临床荟萃, 2006, 21(10): 685-689.
- [12] Austin MA, Hokanson JE, Brunzell JD. Characterization of low-density lipoprotein subclasses: methodologic approaches and clinical relevance[J]. Current Opin Lipidol, 1994, 5(6): 395-403.
- [13] 李健斋,王抒. 低密度脂蛋白、脂蛋白(a)与冠心病[J]. 中华医学检验杂志, 1999, 22(1): 5-8.

(收稿日期: 2011-10-20)

(上接第 3 页)

- binding protein modulating methicillin resistance in staphylococcus aureus [J]. BMC Microbiol, 2009, 9: 15.
- [6] 朱以军,李向阳. 荧光实时 PCR 法检测耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的研究[J]. 中华医药感染学杂志, 2007, 17(7): 898-900.
 - [7] 陈弟,胡大春. 分子生物学技术检测 MRSA 的研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(5): 475-477.
 - [8] 潘钦石,周铁丽,林晓梅,等. 四种方法检测耐甲氧西林金黄色葡萄

球菌的结果比较[J]. 温州医学院学报, 2004, 34(1): 63-64.

- [9] Ender M, McCallum N, Berger-Bächi B. Impact of mecA promoter mutations on mecA expression and beta-lactam resistance levels [J]. Int J Med Microbiol, 2008, 298(7/8): 607-617.
- [10] 汪家政,范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 29-31.

(收稿日期: 2011-08-27)