

文章编号 1004-924X(2005)02-0151-07

微流控分析芯片在线尿中蛋白及 LDH 同工酶检测

金庆辉¹, 庄贵生¹, 刘菁², 贾春平¹, 王惠民³, 赵建龙^{1,2}

(1. 中国科学院上海微系统与信息技术研究所, 上海 200050;

2. 中国科学院研究生院, 北京 100039; 3. 南通大学附属医院, 江苏南通 226001)

摘要:利用 MEMS(微机电系统)标准光刻、湿法腐蚀以及低温键合技术制作了微流控分析芯片。在自制的紫外吸收微芯片生化分析仪上,利用该芯片对临床妊娠高血压和多发性骨髓瘤患者的尿液样本进行了在线芯片电泳分析,得到了与医院常规诊断方法一致的诊断结果,而此法进行一次分析仅需要 2 min,且试剂消耗量少,这是常规方法不能比拟的。也以 LDH 同工酶标准品为分析对象,对芯片在线同工酶诊断进行了初步研究,初步实现了 LDH₁ 和 LDH₅ 混合样本的片上分离、孵育反应和产物检测。

关键词:微流控分析芯片;毛细管电泳微芯片;尿蛋白;LDH 同工酶

中图分类号:Q657 文献标识码:A

On-line detection of urinary protein and lactate dehydrogenase isoenzyme by capillary electrophoresis microchip

JIN Qing-hui¹, ZHUANG Gui-sheng¹, Liu Jing²,

JIA Chun-ping¹, WANG Hui-min³, ZHAO Jian-long^{1,2}

(1. *Biochip Group, Shanghai Institute of Microsystem and Information Technology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200050, China*; 2. *Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China*; 3. *Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, China*)

Abstract: The microfluidic chips were fabricated with standard photolithography, wet etching and low-temperature bonding techniques of MEMS(Micro-electro-mechanical system). Clinical urine samples from gestational hypertension syndrome and multiple myeloma patients were analyzed with the microfluidic chips on home-made UV absorption-based biochem-analysis instrument. The results are in accordance with those from standard urinary proteins assay method. The advantages of microchip-based urinary protein assays such as reduction in analysis time (2 min) and reagent consumption display great superiority over the standard urine assay method. Standard models of lactate dehydrogenase isoenzymes were also selected as the samples for initial study of on-chip LDH assay. The integration

收稿日期:2005-02-14;修订日期:2005-04-09.

基金项目:国家 863 计划项目(No. 2002AA2Z2021, 2004AA4042522)

of on-chip enzyme separation, enzyme reaction and product detection for mixture of LDH₁ and LDH₃ was realized.

Key words: microfluidic chip; capillary electrophoresis microchip; urinary proteins; lactate dehydrogenase isoenzymes

1 引言

集成生物化学样品分析处理、生化反应、电泳分离以及检测的微流控分析芯片 (Microfluidic chip) 是上世纪 90 年代发展起来的一个新兴的研究领域。由于其在生物医疗、疾病诊断、环境监测、法医鉴定等众多领域广阔的应用前景,得到了各大研究机构的极大重视,近年来得到了长足的进步和发展。并逐渐显示了其广阔的市场应用前景。

微流控毛细管电泳芯片是微流控芯片技术发展较为成熟的一项芯片在线分析技术。早在 1992 年,瑞士科学家 Manz^[1] 等就报道了毛细管电泳微芯片这种新型分离分析技术,首次向世人展示了微流控分析芯片的雏形和优势,该项技术随后引起了广泛的兴趣和各大研究机构的研究。近年来,毛细管电泳微芯片已成功用于 DNA^[2]、多肽^[3]、氨基酸^[4]、药物分子等的分离分析和检测。

尿蛋白和血清乳酸脱氢酶(LDH)的诊断检测是临床检验的 2 个重要项目。在肾脏疾病或其他疾病引起的肾脏损伤中,常出现血液中的蛋白质从肾脏排出的现象,因此尿中蛋白质的检测成为临床上监测肾脏疾病及其他相关疾病的重要诊断指标之一;乳酸脱氢酶是由位于第 11 和第 12 对染色体上的 LDHA 和 LDHB 2 个位点所决定的 H 或 M 2 种亚基所构成的四聚体^[5],可形成 5 种同工酶。乳酸脱氢酶广泛存在于人体各组织中,虽然检测其总活性意义不是很大,但各种组织中同工酶含量差异较大,因而检测乳酸脱氢酶同工酶

对临床诊断如肝脏、心血管、血液等疾病时显得十分重要。传统的尿蛋白以及 LDH 同工酶的临床检测方法一般使用醋酸纤维素膜电泳、琼脂糖凝胶电泳,或者免疫化学法、ELISA 法、单克隆抗体法以及化学法等,这些方法均需洗脱或扫描等步骤,操作费时,且需要特殊设备,价格昂贵,仪器较为庞大,且检测成本高,一般医院或患者无法承受。毛细管电泳作为一种新型的技术平台具有高效、低耗、自动化程度高等优点^[6-7]。而毛细管电泳芯片除了具有常规电泳方法无法比拟的优势如高效、低耗等,还具有很多优于常规毛细管电泳分析方法的优点,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,试剂消耗量少等,且基于芯片电泳方法研制的分析仪器体积小,集成化程度高,市场上已经出现了这样的分析仪器,如安捷伦 2100、岛津公司的 MCE-2010 系列微芯片电泳分析仪等。

我们基于 MEMS 技术设计制作毛细管电泳微芯片,采用自制的芯片电泳紫外检测分析仪对临床多个病种进行了分析,并利用本仪器首次采用芯片电泳方法对 LDH 同工酶标准品进行了在线分析。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

自制的芯片电泳紫外检测分析仪,由 50 W 氙灯光源,光路系统,PMT(HC120-5,日本滨松株式会社)光电转换系统,电泳高压模块系统(天津东文高压电源厂),以及控制、采集、滤波放大电路等组成,通过软件自动处理、显示存储,实现对样品的分

析检测。

临床病人尿样由南通大学附属医院提供,尿样在实验前进行透析、浓缩预处理。1 mol/L NaOH 溶液、pH 10.5 浓度 75 mmol/L 硼酸盐和 pH 9.4 NaCO₃-NaHCO₃ 缓冲液实验前新鲜配制,20 × 10⁻³ mol/L NAD⁺ (Sigma 公司 N-0632)、51.6 × 10⁻³ mol/L 乳酸锂(Lithium L-Lactate, Sigma 公司 L-2250)。NADH (Sigma 公司 N-8129), NAD 钠盐(Sigma 公司 N-0632), LDH1 纯品(Sigma 公司 L-0377)。实验过程中所用试剂均为分析纯,实验用水为 18 MΩ/cm 的超纯水,所配试剂使用前用 0.22 μm 的微孔滤膜过滤。

2.2 芯片设计制作

芯片掩模设计采用 L-edit 8.33 软件完成,掩模板由南京五十五所根据掩模设计制作。芯片采用石英玻璃为制作材料,以电子束蒸发铬金属层作为图形腐蚀的保护层。

芯片制作过程如图 1,经光刻、曝光、显影将掩模板的图形转移到基片上,然后用铬腐蚀液(硝酸铈铵+高氯酸)去掉图形部分铬金属层,接着放入玻璃腐蚀液(HF:H₂O₂:HAC=2:1:1)玻璃腐蚀(在 40 °C 下腐蚀 40 min),最后将基片和盖片键合在一起,完成芯片的制作。采用的芯片键合方法不需芯片的高温烧结。基片、盖片表面严格清洗后,转移到真空干燥箱中完成预键合后,然后在芯片上施加一定压力,在 200 °C 真空条件下进行芯片键合退火过程,以提高键合强度。经剪切力测试,本法键合的芯片,键合剪切力强度可以达到 3 kPa,键合强度满足要求。

图 2 所示为加工好的芯片示意图,整个芯片大小为 64 mm × 32 mm,芯片微管道宽 100 μm,深约 30 μm,芯片进样池到十字交叉点长 4 mm,有效分离长度为 42 mm,储液池的直径为 2 mm。

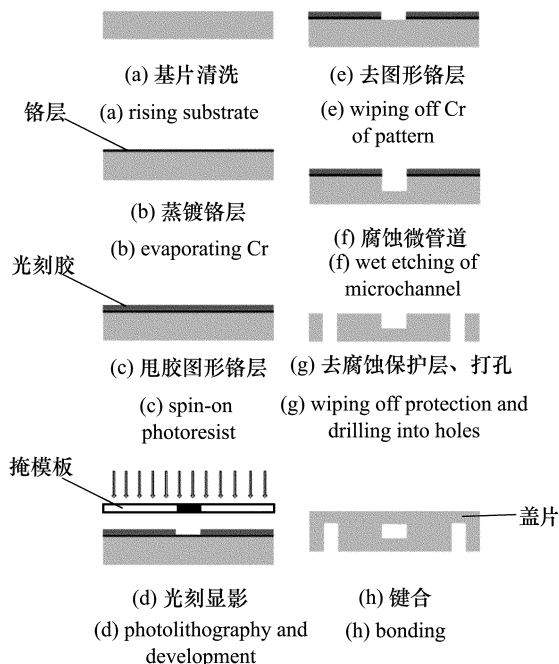


图 1 微芯片制作工艺过程

Fig. 1 Micromachining of microchip

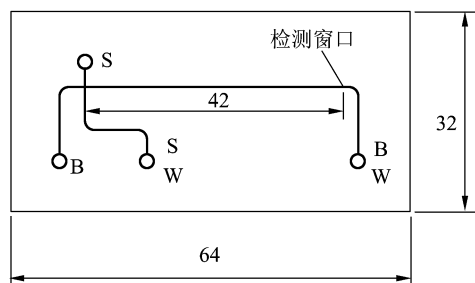


图 2 芯片设计示意图 S:样品池,SW:样品废液池,B:缓冲液池,BW:缓冲液废液池

Fig. 2 Schematic illustration for microchip where S: sample reservoir, SW: sample waste reservoir, B: buffer reservoir, BW: buffer waste reservoir

2.3 芯片微管道处理

芯片初次使用前,需要对微管道进行预处理,且在使用前后均需要进行芯片处理以及管道清洗。预处理过程如下:去离子水冲洗→抽干→1 mol/L NaOH 注于微管道平衡浸泡 30 min→抽干→去离子水冲

洗→抽干。实验前管道处理:去离子水冲洗→抽干→缓冲液冲洗→抽干→缓冲液注于微管道;实验后管道清洗:各储液池抽干→去离子水冲洗→抽干→10% SDS 冲洗→10% SDS 浸泡 5 min→抽干→去离子水冲洗→抽干。

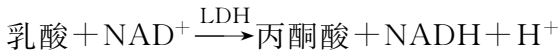
2.4 尿蛋白以及 LDH 同工酶检测原理

2.4.1 尿蛋白检测原理

尿蛋白检测原理采用紫外吸收光度法,利用蛋白在 214 nm 左右有特征吸收,通过 PMT 监测通过芯片检测窗口的光信号变化,并将这一信号转变为电信号,通过采集电路以及软件进行记录和处理。

2.4.2 LDH 同工酶反应原理

LDH 同工酶活性测定方法及原理见反应方程式:



LDH 同工酶在适当的 PH 条件下可催化 NAD^+ 与乳酸反应产生 NADH 和丙酮酸, NADH 在 340 nm 时有一特异吸收峰,而 NAD^+ 却没有,因此可根据吸光度的变化、NADH 的生成量来间接测定 LDH 同工酶的活性。NADH 吸光度变化的检测原理同尿蛋白,通过 PMT 检测 NADH 样品区带通过检测窗口的光信号变化,并转化为电信号,进行记录和处理。

2.4.3 电泳操作过程

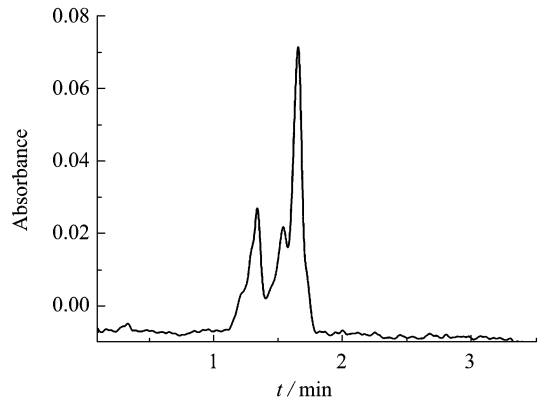
尿蛋白检测电泳操作模式:进样时, sample 池加 +500 V,进样 15 s, sample 废液池接地, buffer 池和 buffer 废液池悬空;分离时, buffer 池加 +2000 V, buffer 废液池接地, sample 池和 sample 废液池悬空。LDH 同工酶在线孵育电泳操作方法如下:首先 sample 池加 +500 V,进样 30 s, sample 废液池接地, buffer 池和 buffer 废液池悬空;然后进行孵育前预电泳,此时 buffer 池加 +2000 V, buffer 废液池接地, sample 池和 sample 废液池悬空,电泳

2 min 后停止电泳,在线孵育 5 min;然后再进行分离,按照分离模式进行操作。

3 结果与讨论

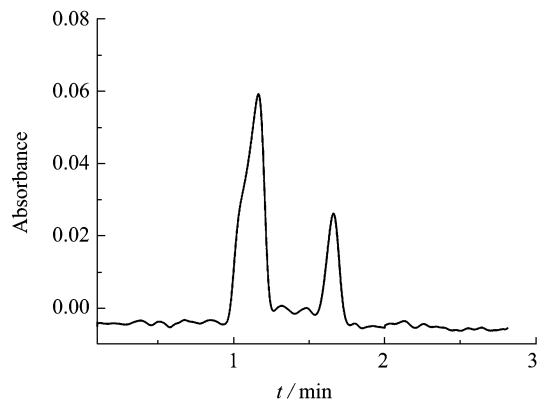
3.1 临床尿蛋白芯片电泳在线分析

在以往研究^[8]的基础上,选取南通医学院附属医院住院及门诊患者,留取尿蛋白“++”以上的尿样。经肾内科与心血管内科确诊的肾损害患者多例,其中包括妊娠高血压症等,其他非肾源性尿蛋白升高者如多发性骨髓瘤。



(a) 妊娠高血压症

(a) Gestational hypertension syndrome



(b) 多发性骨髓瘤

(b) Multiple myeloma

图 3 临床病人尿蛋白芯片电泳谱图

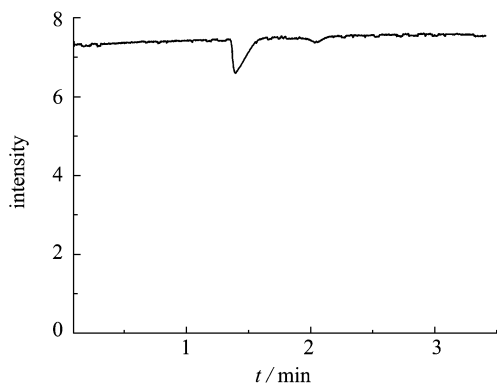
Fig. 3 Electropherogram of clinical urinary proteins

以往的研究^[8-9]告诉我们,可根据蛋白质的出峰位置判断蛋白质种类。经毛细管电泳微芯片对上述两种病例患者尿液进行分离分析,其中妊娠高血压病人电泳图谱如图 3(a),由图谱可知病人尿液以球蛋白为主要成分;多发性骨髓瘤病人电泳图谱如图 3(b),由图谱可知病人尿液以白蛋白为主要成分。利用 Helena 快速电泳系统(REP)分别对这两种病人的尿样进行常规临床琼脂糖凝胶电泳,结果与芯片电泳结果进行了对照(略),结果一致。这两类病人尿蛋白按医学上分类,图 3(a)为选择性蛋白尿,图 3(b)为溢出性蛋白尿。微芯片电泳方法可将蛋白尿初步分为选择性蛋白尿、非选择性蛋白尿及溢出性蛋白尿,电泳仅需 2 min,即可得到结果,整个操作过程,包括芯片清洗、分析样品灌注、芯片在线分离,可在 30 min 内完成,具有良好的重复性。常用的尿蛋白电泳主要有醋酸纤维素薄膜电泳、琼脂糖电泳、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),尤以 SDS-PAGE 应用最为普遍,可分离出不同分子量的蛋白质,但该法操作极为繁琐,至少花费一天时间;采用 Helena 快速电泳系统进行琼脂糖凝胶电泳,自动化程度相对高,而且由于采用凝胶试剂盒,操作相对简便,花费时间也有所减少,但试剂盒昂贵,临床监测成本高。而我们的微芯片电泳方法在这些方面则充分体现了其优势。

3.2 LDH 同工酶芯片电泳在线分析

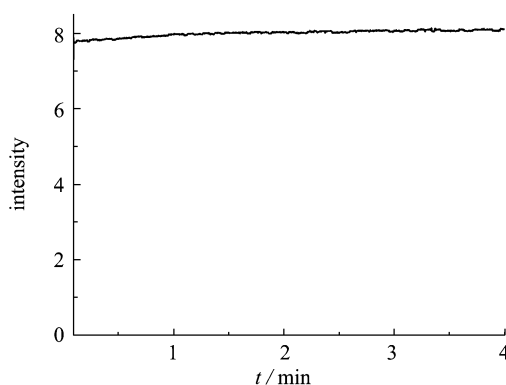
缓冲体系以及 pH、反应温度、底物浓度等均是酶反应的关键所在。酶反应有一个最佳的 pH,极端 pH 时有利于电渗流,但过高的 pH 会抑制 LDH 同工酶中 LDH5 活性,国际临床化学学会(IFCC)推荐的 LDH 酶反应 pH 为 9.5 左右,在我们的实验中,采用 pH 9.4 的缓冲体系。酶反应的孵育温度有文献报道为 24 °C,而在人体体温 37 °C 时,酶活性最佳,为酶反应的最佳温度,本文采用的 37 °C 作为酶的孵育温度。

如图 4 所示,为 LDH 同工酶底物的电



(a) NADH 浓度为 10g/L, 硼酸盐缓冲液, pH10.5

(a) NADH concentration: 10g/L, pH10.5 borate buffer



(b) NAD⁺ 浓度为 10g/L, 硼酸盐缓冲液, pH10.5

(b) NAD⁺ concentration: 10g/L, pH10.5 borate buffer

图 4 酶底物芯片电泳图谱

Fig. 4 Electropherogram of substrate

泳吸收图谱,仪器光源发射波长设在 340 nm。从图中可以看出,NADH 在 340 nm 处有一特征吸收(a),而 NAD⁺ 没有吸收(b)。这也正是我们进行芯片 LDH 同工酶孵育检测的原理(见 2.4.2)。

选择 37 °C 作为最佳的酶反应温度,充分的反应时间 30 min。经过实验,NaCO₃-NaHCO₃ 是各种常规电泳缓冲体系中较佳的孵育缓冲体系。为了能充分发挥酶的催化活性,一般底物浓度选择于 10 倍 K_m 值, K 乳酸 = 5.16 ± 1.2 × 10⁻³ mol/L,因此本文选择乳酸锂的浓度为 51.6 × 10⁻³ mol/L。

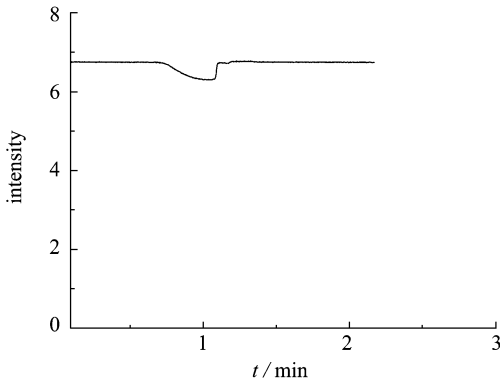
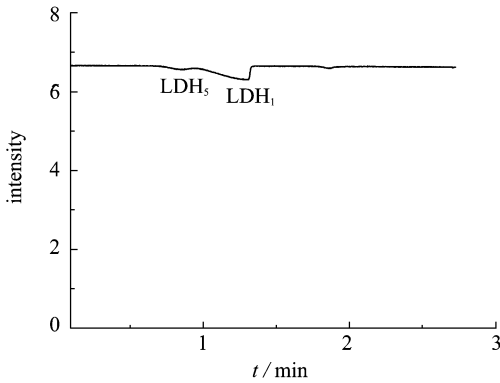
(a) LDH₁ 在线孵育电泳图谱(a) Electropherogram online in cubating of LDH₁(b) LDH₁ 和 LDH₅ 混合样品在线孵育电泳图谱(b) Mixture of LDH₁ and LDH₅ online incubating

图 5 LDH 同工酶芯片在线孵育电泳图谱

Fig. 5 Electropherogram of based-chip online incubating

图 5 为 LDH 标准品芯片在线孵育产物电泳谱图,底物乳酸锂、辅酶 NAD⁺ 与

NaCO₃-NaHCO₃ 缓冲液 (pH 9.4) 混合在一起,既作为反应液,同时也作为电泳缓冲液。其中图 5(a)为 LDH₁ 芯片在线孵育电泳图谱,图 5(b)为 LDH₁ 和 LDH₅ 混合样品在线孵育电泳谱图。整个电泳操作过程如下,首先在样品池加 +500 V,进样 30 s,然后在 buffer 池中加 +2 000 V,分离 1 min;然后停止分离,并进行在线孵育 5 min,再次在 buffer 池中加 +2 000 V,继续分离,并在检测窗口得到孵育产物的特征吸收峰图。

4 结 论

尿蛋白电泳结果是对病因诊断及病情严重程度判断的重要依据之一,而常规的尿蛋白电泳方法耗时长且试剂消耗量大。基于 MEMS 微加工技术制作了微流控毛细管电泳微芯片,利用紫外吸收光度法实现了微芯片电泳进行尿蛋白检测分析。该法可在 2 min 内完成一次样品的电泳分析,且试剂消耗量少。微流控分析技术作为近年来发展起来的一种新的分析技术,使芯片酶诊断成为近年来一个芯片研究热点。但鲜见芯片上进行 LDH 同工酶的分析,本文就此问题进行了初步研究,得到了一定结论,成功实现了芯片在线孵育同工酶,实现在线检测同工酶孵育产物。随着进一步的研究,微流控毛细管电泳芯片在临床上将产生广阔的应用前景。

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[J]. *Anal. Chem.*, 1992, 64: 1926-1932.
- [2] WOODEY A T, MATHIES R A, Ultra-high-speed DNA sequencing using capillary electrophoresis chips[J]. *Anal. Chem.*, 1995, 67: 3676-3680.
- [3] HOFMAN O, CHE D, CRUICKSHANK K A, *et al.* Adaptation of capillary isoelectric focusing to microchannels on a glass chip[J]. *Anal. Chem.*, 1999, 71: 678-686.
- [4] HUTT L D, GLAVIN D P, BADA J L, *et al.* Microfabricated capillary electrophoresis amino

- acid chirality analyzer for extraterrestrial exploration[J]. *Anal. Chem.*, 1999, 71: 4000-4006.
- [5] 沈同,王镜岩. 生物化学[M]. 北京:高等教育出版社,2002.
SHEN T, WANG J Y. *Biochemistry*[M]. Beijing:Higher Education Press, 2002. (in Chinese)
- [6] LEHMANN R, VOELTER W, LIEBICH H M. Capillary electrophoresis in clinical chemistry [J]. *J. Chromatogr. B.*, 1997, 697:3-35.
- [7] JENKINS M A, GUERIN M D, Capillary electrophoresis as a clinical tool[J]. *J. Chromatogr B.*, 1996, 682:23-24.
- [8] LIU Y J, ROBERT S F, CHRISTOPHER T C, *et al.* Electrophoretic separation of proteins on microchips[J]. *J. Microcolumn Separations*, 2000, 12: 407-411.
- [9] CHRISTA L C, SHAKUNTALA D M, HARRISON D J. Microchip-based capillary electrophoresis of human serum proteins[J]. *J. Chromatogr. A.*, 1997, 781: 271-276.

作者简介:金庆辉(1972—),男,江西玉山人,中国科学院上海微系统与信息技术研究所生物芯片项目组,副研究员,主要研究方向为 MEMS 生物微系统。E-mail: jinqh@mail.sim.ac.cn;
庄贵生(1980—),男,山东新泰人,中国科学院上海微系统与信息技术研究所生物芯片项目组博士研究生,主要研究方向为 MEMS 电泳芯片微系统。