中国科学 B辑:化学 2009 年 第 39 卷 第 9 期: 904 ~ 909
www.scichina.com chem.scichina.com
《中国科学》杂志社
SCIENCE IN CHINA PRESS

芯片自由流梯度电场电泳及其应用

王平利, 张丽华*, 梁振, 张玉奎

国家色谱研究分析中心; 中国科学院大连化学物理研究所; 中国科学院分离分析化学重点实验室; 大连 116023

* 通讯作者, E-mail: lihuazhang@dicp.ac.cn

收稿日期: 2009-05-30; 接受日期: 2009-06-19

摘要 尽管在垂直的电场和流体场作用下, 采用芯片自由流电泳(μ-FFE)可实现样品的连续微分离和制备, 但是由于在运行过程中, 存在分析物的区带展宽问题, 会直接影响样品的分离效果. 在本文中, 在施加固定电压的情况下, 通过向和分离缓冲液相同的电极缓冲液中添加硫酸钠的方法, 在分离腔内形成了梯度电场. 通过对罗丹明B和甲基绿混合物的分离发现, 在均一电场下, 施加400 V分离电压, 混合物需 2 min 才能完全分离; 甲基绿的区带宽度为 3.8 mm, 与罗丹明 B 的分辨率是 3.2. 在向电极缓冲液中添加 5 mmol/L 硫酸钠形成的电场梯度下, 施加 300 V 的分离电压, 两种染料可在 10 s 内完成分离; 在 20 s 时, 甲基绿的区带宽度被压缩到 0.5 mm, 检测灵敏度提高了7倍以上; 与罗丹明B的分辨率可达到16.2. 此外, 该方法还被用于牛血清白蛋白的富集. 与施加均一电场相比, 蛋白质的检测灵敏度得到了显著提高. 上述结果表明, 通过在 μ-FFE 中引入梯度电场, 可有效提高样品的分辨率、检测灵敏度和分析速度.

关键词
芯片自由流电泳
梯度电场
分离富集
染料
蛋白质

1 引言

自由流电泳(free flow electrophoresis, FFE)是Hanning等人[1] 于 1960s提出的一种连续的电泳分离技术. 与传统凝胶电泳和毛细管电泳相比, FFE可通过对样品的连续进样和分离, 实现目标组分的制备. 然而采用商品化的FFE仪器, 通常样品的处理量较大, 分析时间较长. Manz 等人在 1994 年首次在芯片上实现了芯片自由流电泳(μ-FFE)[2], 有效地解决了传统FFE存在的问题.

目前μ-FFE有多种分离模式, 如区带电泳[2~5]、等电聚焦[6~8]、等速电泳[9]等, 已成功用于染料[5,9]、氨基酸[2,3]、肽及蛋白质[4,6,8]等样品的分离. 然而, 对于小分子化合物的分离, 通常由于扩散比较严重, 会影响样品的分离效果.

电场梯度聚焦是由 Koegler 和 Ivory 在 1996 首次提出 [10] 的一种可同时实现样品分离富集的分析方法. 从梯度形成的本质可分为三类: 浓度梯度、温度梯度和数控电压梯度. 浓度梯度主要通过在分离通道截面逐渐减小, 并在通道周围制作离子可透过性膜[10,11~14]以及通过混和器在分离通道内形成浓度梯度[15]. 沿分离通道形成温度梯度, 选择导电性随温度变化的离子做缓冲盐, 在相同缓冲盐浓度下, 沿分离通道形成电场梯度[16,17]. 数控电压梯度[18]是在分离通道内设计一组电极阵列, 每个电极的电压可单独控制, 施加不同的电压, 在分离通道内形成电场梯度. 然而上述方法会增加芯片设计或实验操作的难度.

2008 年, Kolheyer等[19]提出了自由流电场梯度分

离模式, 但并没有进行详细研究和应用. 在本文中我们将 μ-FFE 和梯度电场(gradient electrical field, GEF)结合, 形成芯片自由流梯度电场电泳(μ-FFGEFE). 在固定流速下, 考察了电场梯度、电压以及运行时间对分离效果的影响, 并实现了甲基绿和罗丹明 B 的分离和富集. 此外, 还将这种方法应用于对牛血清白蛋白(BSA)的富集.

2 实验部分

2.1 试剂与实验材料

羟丙基甲基纤维素(hydroxypropyl methylcellulose, HPMC)和异硫氰酸荧光酯(fluorescein isothiocyanate, FITC) (Acros Organic), Tris 和 BSA (Sigma), Triton (科密欧试剂有限公司), 甲基绿和罗丹明 B (上海化学试剂有限公司), Pt 电极(常熟贵金属有限公司), 实验用水均为(Millipore)处理的去离子水.

2.2 仪器

TS-1B 四通道注射泵和 TJ-1A 单通道注射泵(保定兰格恒流泵有限公司), SMZ1500 荧光体视显微镜(Nikon, Japan), Infinity 2.0 CCD (Lumenera, Canada), JKG-2A 光刻机(上海学泽光学机械有限公司), 直流高压电源(天津恒博电源有限公司).

2.3 FFE 芯片

自制玻璃FFE芯片结构如图 1 所示. 芯片经光刻、湿法刻蚀、室温键合而成[20], 分离腔长 42 mm×宽 23 mm×深 28 μm.

两条电极分别通过孔 1 和 6 以及孔 5 和 8 固定,

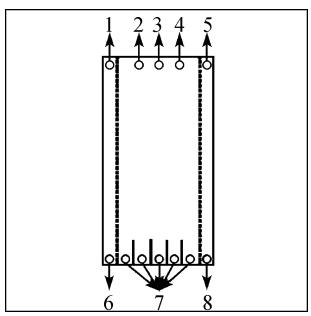

图 1 FFE 芯片结构示意图

孔 1 和 5 是电极缓冲液入口, 孔 6 和 8 是电极缓冲液出口. 样品从孔 2、3 和 4 中任一孔引入, 其余两个孔引入分离缓冲. 孔 7 是馏分收集孔, 之间的实线代表原位刻蚀的玻璃条, 用来防止已分离馏分在出口处再混和. 虚线代表原位刻蚀的一组玻璃阵列, 用来短时间内电解产生的气泡进入分离腔.

2.4 缓冲液和样品制备

分离缓冲液：4.5 mmol/L Tris-1.5 mmol/L 硼酸钠–0.2% (*W*/*V*)HPMC-0.1 (*V*/*V*)% Triton; 电极缓冲液：含有一定浓度硫酸钠的分离缓冲液. 上述缓冲液均超声 5 min 去除气泡后使用.

BSA标记：向 1 mL 2 mg/mL的BSA(100 mmol/L $NaHCO_3$, pH 9.0)溶液中加入 10 μL 1 mg/mL的FITC (DMSO), 室温避光过夜.

2.5 实验操作

分离前用分离缓冲以 6 μL/min 平衡分离腔 30 min, 罗丹明 B 和甲基绿的混合物从孔 3 以 0.1 μL/min 引入, 分离缓冲从孔 2 和 4 以 6 μL/min 进入; 染料在分离腔中形成稳定条带后施加电压进行分离. 每次分离结束后, 彻底冲洗分离腔, 进行下次分离. BSA 从孔 2 以 2 μL/min 引入, 分离缓冲从孔 3 和 4 以 6 μL/min 引入, BSA 形成稳定条带后施加电压进行富集. 其他操作与染料分离时相同.

3 结果与讨论

3.1 分离富集原理

在μ-FFE 分离腔中, 分别引入不同浓度的电极缓冲液和分离缓冲液, 使得分离腔内形成具有不同电导的流体区带. 当施加分离电压后, 电解质浓度低的区域电压大, 电场强度高; 反之, 电解质浓度高的区域电压小, 电场强度低. 因此, 如图 2 所示, 当在 μ-FFE 分离腔的两侧引入向分离缓冲液中添加了硫酸钠的电极缓冲液后, 在电场作用下, 即可形成电极槽区域电场强度低、分离腔内电场强度高的情况, 并在高低电场之间存在一个界面, 如图中白线所示. 当分析物从高电场区域向电极方向迁移, 并到达界面时, 迁移速度会减慢. 因此, 会在此界面上发生堆积, 达到富集的效果.

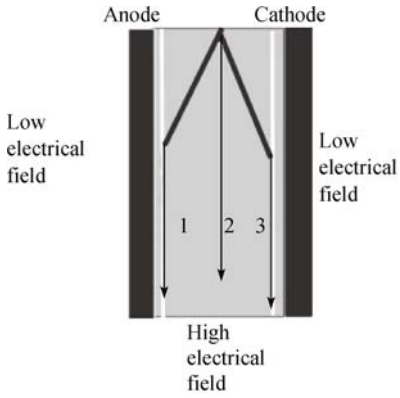

图 2　μ-FF-GEFE 原理示意图

图中：浅灰色矩形区域代表含有分离缓冲液的 FFE 分离腔; 黑色矩形区域代表含有电极缓冲液的电极槽; 白色线条代表分离缓冲液和电极缓冲液的界面, 即梯度电场的界面; 1 代表带负电的分析物, 2 代表中性分析物, 3 代表带正电的分析物. 中性的分析物在垂直电场作用下不发生偏移(完全抑制 EOF 时). 带负电和正电的分析物分别向正极和负极迁移; 当迁移至高低电场界面上时, 速度减慢, 开始富集

3.2　梯度电场分离富集的影响因素

系统考察了因采用不同电极缓冲液产生的电场梯度对罗丹明 B 和甲基绿分离的影响. 在实验中, 分别采用向分离缓冲液中添加 1 mmol/L, 3 mmol/L, 5 mmol/L 和 7 mmol/L 的硫酸钠作为电极缓冲液.

图 3(a),(b)分别为不同硫酸钠浓度下, 甲基绿和罗丹明 B 分离的照片及转化后的谱图. 从中可以看出, 随着硫酸钠浓度的增加, 甲基绿的宽度由 3.6 mm 减少到 0.3 mm, 峰高由 5 增加到 40. 这是因为, 随着向电极缓冲液中添加的盐浓度的增加, 所形成的电场梯度差异更加明显. 因此, 甲基绿的区带在电场梯度界面上被压缩的程度增加, 富集效果越明显.

尽管当盐浓度增加到 7 mmol/L 时, 甲基绿富集后的区带更窄, 但是由于系统的电流过大, 电解产生的气泡会很快进入分离腔, 改变电场在整个分离腔中的分布. 因此, 我们最终选择添加 5 mmol/L 硫酸钠的分离缓冲液作为电极缓冲液.

(1) 分离电压.　系统考察了 100, 200, 300 和 400 V 分离电压下罗丹明 B 和甲基绿的分离和富集效果. 从图 4 可看出, 在 100 V 下两种染料不能完全分开, 且甲基绿的峰非常宽, 约 4 mm. 当电压增加到 200 V 时,

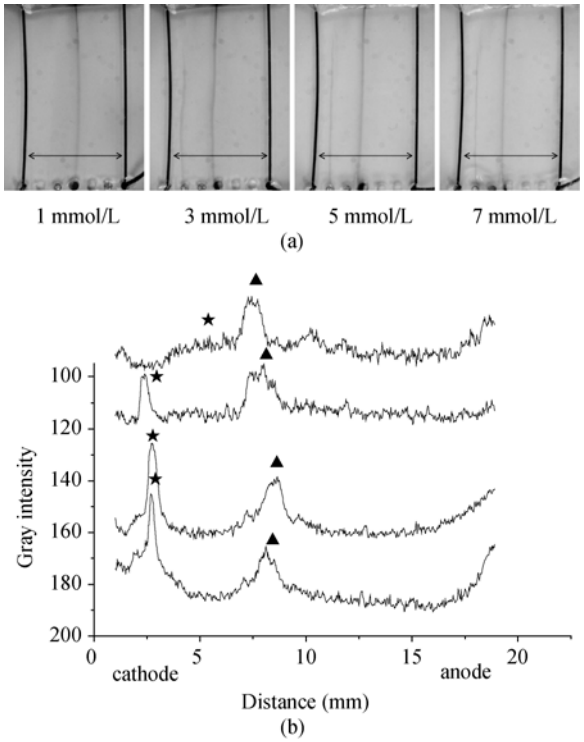

图 3　不同硫酸钠浓度的电极缓冲液对染料分离富集的影响

实验条件：电极缓冲液中分别添加了 1 mmol/L, 3 mmol/L, 5 mmol/L 和 7 mmol/L 的硫酸钠(由上至下); 分离时间：20 s; 样品：1 mg/mL 甲基绿和罗丹明 B 混合物; 电压：300 V. 图中, ★甲基绿, ▲罗丹明 B; (b)图从(a)图中双箭头线所示位置进行灰度扫描

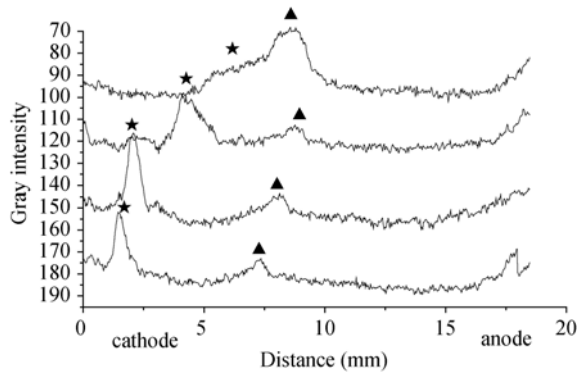

图 4　电压对染料分离富集的影响

实验条件：电极缓冲液, 含有 5 mmol/L 硫酸钠的分离缓冲, 电压 100, 200, 300 和 400 V(由上至下); 分离时间 20 s; 符号意义与图 3 相同

二者完全分开, 甲基绿已经开始富集, 但还没有富集

完成, 条带仍在迁移中效果不明显; 此时二者的分辨率是 5. 当电压继续增加到 300 V 时, 经过 20 s 的分离, 二者完全分开, 且分辨率达 16.2. 而随着电压继续增加到 400 V, 由于过量的焦耳热和电极槽内因电解产生的气泡, 会干扰样品的分离. 因此, 最终选择 300 V 作为最佳分离电压.

(2) 分离时间. 在 5 mmol/L 梯度、300 V 电压下系统考察了分离时间对罗丹明 B 和甲基绿分离富集效果随时间的变化. 从图 5 可以看出到, 尽管施加电压 5 s 后, 二者就即可分离, 但是甲基绿条带的峰很宽, 还未出现富集现象. 当时间增加到 10 和 15 s 时, 甲基绿已经开始富集, 10 s 峰宽约分别为 5 mm, 15 s 时峰宽约 2 mm, 但仍在迁移中, 条带尚未完成富集. 继续增加时间, 可以看出, 采用 20 和 25 s 的分离时间, 甲基绿的峰形和位置没有明显变化. 这说明, 甲基绿已在 20 s 时到达梯度界面, 完成分离富集.

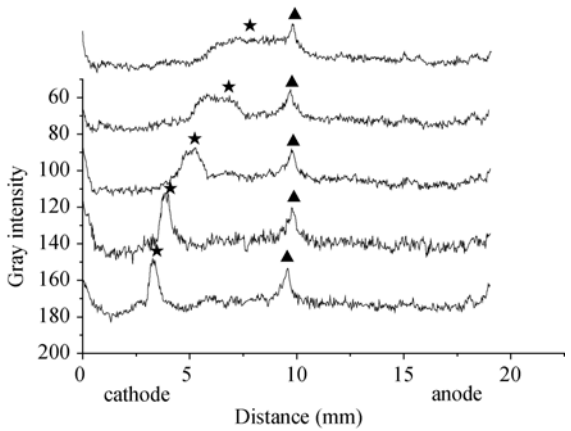

图 5 分离富集效果随时间的变化

实验条件: 电压 300 V; 时间, 5, 10, 15, 20 及 25 s (由上至下), 符号意义与图 3 相同

3.3 染料的分离富集

如图 6 所示, 在梯度电场的最佳条件下, 甲基绿和罗丹明 B 在 10 s 内完全分开; 在 20 s 内, 区带富集完成, 甲基绿的区带被压缩为 0.5 mm, 两种染料的分辨率达到 16.2. 而在均一电场下, 采用 400 V 的分离电压, 两种染料不仅需 2 min 才能分开, 而且甲基绿扩散严重, 峰宽约 3.8 mm, 两者的分辨率仅为 3.2. 与 μ-FFE 相比, 在梯度电场下, 根据区带宽度计算, 甲基绿至少可被富集 7 倍.

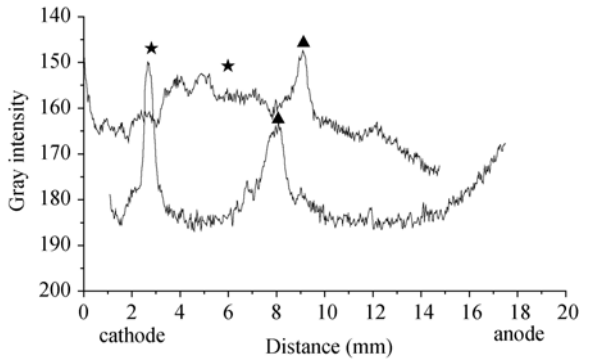

图 6 均匀电场(a)和梯度电场(b)染料的分离富集效果

实验条件: 分离缓冲: 4.5 mmol/L Tris-1.5 mmol/L borate-0.2 % HPMC-1% Triton, 流速 6 μL/min; (a) 电压, 400 V, 电极缓冲液同分离缓冲液, 时间, 2 min; (b) 电压, 300 V, 电极缓冲液为添加 5 mmol·L^{-1}硫酸钠的分离缓冲液, 时间, 20 s; 符号意义与图 3 相同

3.4 BSA 的富集

以 FITC 标记的 BSA 为样品, 在优化的梯度电场条件下, 考察了该方法对蛋白质的富集效果.

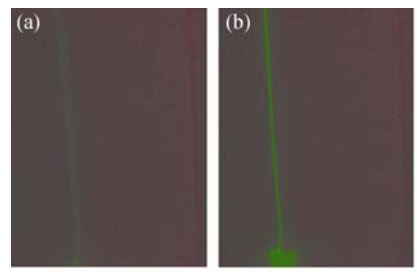

图 7 梯度电场施加前(a)后(b)BSA 的富集效果

实验条件: 分离缓冲、电极缓冲液极其流速与图 4 相同; 样品, 2 mg/mL FITC 标记的 BSA; 流速, 2 μL/min; 电压, 100 V

如图 7 所示, 未施加梯度电场时, BSA 的条带几乎看不到; 当施加梯度电场后, 出现了明显的蛋白条带. 在 100 V 电压下, 20 s 时已到达完全富集. 这说明, 采用 μ-FF-GEFE, 可显著改善蛋白质的检测灵敏度.

4 结论

本文将梯度电场引入 μ-FFE 中, 有效地避免了自

由流电泳分离过程中分析物区带的扩散现象, 同时有效地提高了样品的分辨率、检测灵敏度和分析速度, 有望在复杂样品的痕量组分分离和制备中发挥重要作用.

致谢 本工作得到国家重大科学研究计划(批准号: 2007CB914100)、国家重点基础研究发展计划(编号: 2007CB714503)和国家自然科学基金(批准号: 20775080)资助, 特此一并致谢.

参考文献

1 Hanning K, Hoppe-Seylers Z. Partition of cell particles and macromolecules. Physiol Chem, 1964, 338: 211—227
2 Raymond D E, Manz A, Widmer H M. Continuous sample pretreatment using a free-flow electrophoresis device integrated onto a silicon chip. Anal Chem, 1994, 66: 2858—2865[DOI]
3 Zhang C X, Manz A. High-speed free-flow electrophoresis on chip. Anal Chem, 2003, 75: 5759—5766[DOI]
4 Raymond D E, Manz A, Widmer H M. Continuous separation of high molecular weight compounds using a microliter volume free-flow electrophoresis microstructure. Anal Chem, 1996, 68: 2515—2522[DOI]
5 Fonslow B R, Bowser M T. Free-flow electrophoresis on an anodic bonded glass microchip. Anal Chem, 2005, 77: 5706—5710[DOI]
6 Xu Y, Zhang C H, Janasek D, Manz A. Sub-second isoelectric focusing in free flow using a microfluidic Device. Lab Chip, 2003, 3: 224—227[DOI]
7 Kohlheyer D, Eijkel J C T, Schlautmann S, van den Berg A, Schasfoort R B M. Microfluidic high-resolution free-flow isoelectric focusing. Anal Chem, 2007, 79: 8190—8198[DOI]
8 Albrecht J W, El-Ali J, Jensen K F. Cascaded free-flow isoelectric focusing for improved focusing speed and resolution. Anal Chem, 2007, 79: 9364—9371[DOI]
9 Janasek D, Schilling M, Franzke J, Manz A. Isotachophoresis in free-flow using a miniaturized device. Anal Chem, 2006, 78: 3815—3819[DOI]
10 Koegler W S, Ivory C F. Focusing proteins in an electric field gradient. J Chromatogr A, 1996, 726: 229—236[DOI]
11 Liu J K, Sun X F, Farnsworth P B, Lee M L. Fabrication of conductive membrane in a polymeric electric field gradient focusing microdevice. Anal Chem, 2006, 78: 4654—4662[DOI]
12 Kelly R T, Li Y, Woolley A T. Phase-changing sacrificial materials for interfacing microfluidics with ion-permeable membranes to create on-chip preconcentrators and electric field gradient focusing microchips. Anal Chem, 2006, 78: 2565—2570[DOI]
13 Sun X F, Farnsworth P B, Woolley A T, Tolley H D, Warnick K F, Lee M L. Poly(ethylene glycol)-functionalized devices for electric field gradient focusing. Anal Chem, 2008, 80: 451—460[DOI]
14 Vahey M D, Voldman J. An equilibrium method for continuous-flow cell sorting using dielectrophoresis. Anal Chem, 2008, 80: 3135—3143[DOI]
15 Humble P H, Kelly R T, Woolley A T, Tolley H D, Lee M L. Electric field gradient focusing of proteins based on shaped Ionically conductive acrylic polymer. Anal Chem, 2004, 76: 5641—5648[DOI]
16 Ross D, Locascio L E. Microfluidic temperature gradient focusing. Anal Chem, 2002, 74: 2556—2564[DOI]
17 Munson M S, Danger G, Shackman G J, Ross D. Temperature gradient focusing with field-amplified continuous sample injection for dual-stage analyte enrichment and separation. Anal Chem, 2007, 79: 6201—6207[DOI]
18 Huang Z, Ivory C F. Digitally controlled electrophoretic focusing. Anal Chem, 1999, 71: 1628—1632[DOI]
19 Kohlheyer D, Eijkel J C T, van den Berg A, Schasfoort R B M. Miniaturizing free-flow electrophoresis-a critical review. Electrophoresis, 2008, 29: 977—993[DOI]
20 Wang P L, Tao D Y, Zhang L H, Liang Z, Zhang Y K. Microchip free flow planar reversed phase electrochromatography with monolithic stationary phase. J Sep Sci, jssc.200900223

Micro free flow gradient electrical field electrophoresis and its application

WANG PingLi, ZHANG LiHua*, LIANG Zhen & ZHANG YuKui

National Chromatographic R. & A. Center, Key Laboratory of Separation Science for Analytical Chemistry, Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China

Abstract: Although samples could be continuously separated and prepared by μ-FFE in microscale with orthogonal electrical field and hydrodynamic field, band broadening of analytes is still a serious problem that might affect resolution. In this work, with a fixed applied voltage, a gradient electrical field (GEF) was formed in the separation chamber by adding 5 mmol·L^{-1} sodium sulfate into electrode buffer, although other components were the same as those in separation buffer. Without GEF added, a mixture of methyl green and Rhodamine B was separated completely under 400 V applied voltage for 2 min. The band width of methyl green was 3.8 mm, and the resolution of methyl green and Rhodamine B was only 3.2. With GEF applied, the baseline separation of such two dyes was obtained with 300 V applied voltage for 10 s. In addition, the band width of methyl green was concentrated to 0.5 mm in 20 s, and the detection sensitivity was improved by over 7 times. Furthermore, by such a method, the detection sensitivity of BSA was increased evidently. All these results demonstrated that with the resolution, the separation speed and the detection sensitivity of samples could be improved significantly by μ-FFE with GEF applied.

Keywords: Micro free flow electrophoresis, gradient electrical field, concentration, dye, protein