

## 第一章 文献综述

现代分离分析技术发展的重要方向之一是分离分析方法的微型化。微型化, 不仅指的是样品和试剂消耗量的微量化, 也意味着分离分析仪器的微型化和过程的集成化。20 世纪 90 年代初, Manz[1]等提出了“微全分析系统”的概念, 毛细管电泳的各种模式, 迅速转移到芯片上, 芯片电泳成为微分离技术研究中的一个热点[2,3]。在芯片上可以很方便地构建复杂的管道网络, 进行多通道、多维电泳, 以应用于复杂样品, 特别是生命科学中数目多、成分复杂、痕量的生物样品的分离分析[4]。

本章在简单概述芯片电泳研究现状的基础上, 重点介绍基于磁性材料的芯片技术、芯片等电聚焦以及芯片二维电泳的研究进展及应用。

### 第一节 微流控芯片电泳研究概述

微流控芯片电泳技术是指在不同基质的芯片上构建管道网络, 通过在管道网络的终端施加电压实现样品的进样和快速分离分析的电泳技术。它可以在几分钟甚至更短的时间内进行上百个样品的同时分析, 这种快速分析的能力及分离通道的阵列化, 使得高通量分离分析成为可能。芯片通常只消耗 pL 级的样品, 并且可以实现样品的在线预处理-分离分析全过程。由于其快速、高效、样品消耗少的特点, 成为一个极为活跃的研究热点。

本节简要介绍芯片电泳技术中涉及到的芯片加工与表面修饰、电泳分离和检测技术以及芯片电泳的主要应用方向。

#### 1.1.1 芯片加工技术

由于硅、石英和玻璃材料具有良好的化学惰性和热稳定性, 而且表面修饰研究比较深入, 微加工工艺相对成熟, 所以是目前最常用的芯片基质。但

这类材料加工过程复杂，不利于规模化生产。聚合物材料价格便宜，绝缘性和透光性均较好，成型容易、批量生产成本低，更适合于一次性使用。目前，已被采用的材料有聚甲基丙烯酸甲酯（PMMA）、聚二甲基硅氧烷（PDMS）、聚酰胺（PA）、聚碳酸酯（PC）、聚乙烯（PE）、聚丙烯（PP）、聚苯醚（PPE）、聚苯乙烯（PS）和聚砜（PSU）等，其中以PMMA和PDMS最为常用。其它材料，如硼硅碳氮陶瓷材料、氟化钙等用于芯片的加工制作也见报道。

在复杂样品的分析中，微通道的表面特征对分离结果影响很大。因此，必须根据实际需要对通道表面加以适当修饰。对通道内壁进行修饰通常有两个目的：一是控制电渗流；二是抑制被分析物和通道表面的相互作用。微流控芯片中的表面修饰同毛细管一样，也可以分为两种类型：静态修饰和动态修饰。静态修饰是指化合物（一般为聚合物）通过共价键与通道内壁表面的功能基团相连，或者通过交联反应聚合在通道内壁。动态修饰则是指可溶性表面活性物质吸附在内表面，通过在分析前用含有改性剂的溶液冲洗通道，或者直接将改性剂加入到运行缓冲溶液中来实现。

#### 1.1.1.1 硅材料芯片加工及表面修饰

玻璃芯片最常用的加工技术是从微机械加工技术中借鉴而来的，即所谓的标准微加工刻蚀技术[5]。粉末冲击法（powder blasting）主要利用高压喷口喷出高速粉末产生的机械外力来加工芯片。该方法制作芯片的造价低，而且样品槽和通道的加工可以同时进行。Pu等[6]对粉末冲击法和氢氟酸刻蚀法制造的玻璃芯片的电泳性能进行了比较。研究发现，尽管利用前者加工的通道表面有些粗糙，但仍可以应用于大多数样品的分析中。Belder等[7]利用PVA改性粉末冲击法加工的玻璃芯片通道，进行了手性分离，结果表明分离效率高于未修饰的湿法刻蚀得到的通道。

玻璃和石英芯片的表面修饰可借鉴在生物芯片和毛细管电泳研究中建立的一些表面修饰方法。有机硅烷表面自组装是石英、玻璃芯片表面修饰的主

要方法。硅烷表面自组装就是利用硅氧键水解生成的硅羟基与芯片表面硅羟基脱水发生缩合反应，从而在芯片表面偶联功能化的硅氧烷，其功能基团可用于下一步反应。聚丙烯酰胺和聚乙烯醇是目前两种比较常见的石英、玻璃芯片的表面修饰涂层。在微流控芯片表面，聚丙烯酰胺表面涂层技术有一些新的发展。Liu等人重新解释并验证了二甲叉丙烯酰胺交联剂对于提高聚丙烯酰胺涂层性能及稳定性显著作用[8,9]。他们认为在石英表面有一些很小晶体缺陷，如凹陷，硅烷化试剂处理不到，也没有丙烯酰胺涂层覆盖，二甲叉丙烯酰胺交联缺陷附近的聚丙烯酰胺，从而遮盖缺陷，减少了裸露表面，提高了分离效率。而且，交联可以减缓表面聚丙烯酰胺的流失，从而延长涂层寿命。试验表明，与未交联涂层相比，交联涂层可进一步降低电渗流，提高蛋白质等电聚焦和碱性蛋白质的电泳效率，涂层通道可使用几百次以上。Razunguzwa [10]等利用N-(三乙氧基甲硅烷基 丙基)-O-聚(乙撑氧)聚氨酯反应生成的PEG-硅烷涂层修饰玻璃芯片。该涂层能够抑制电渗流、降低被分析物在分离通道中的吸附，可以应用于芯片电泳-质谱在线联用。

纤维素衍生物是最常用的动态涂层表面改性剂，此类的改性剂通常具有筛分和动态涂层双重作用。也有的动态改性剂是利用静电吸附原理对表面极性改性，如多电荷季铵盐类聚合物，在很宽的pH范围内带有很强的正电，可以牢牢地被带有负电的玻璃芯片吸附，而纳米金溶胶带有负电，可以继续吸附在多电荷季铵盐类聚合物涂层表面，从而制备出纳米金涂层的芯片通道[11]。

### 1.1.1.2 聚合物芯片加工及其表面修饰

因聚合物材料性质不同，芯片加工方法也各不相同。目前，常用的方法有注入成型法(injection molding)、激光去除法(laser ablation)、烙印法(imprinting)、冲压处理法(stamping)和 LIGA(Lithographie Galvanoformung Abformung)技术(平版印刷术、电镀和成型的结合)等。

注入成型法主要包括两个步骤：制作模具和转移通道模式。模具的制造方法有很多，应根据通道尺寸和精确度的要求加以选择。对于大于 100  $\mu\text{m}$  的结构，可以采用传统的计算机数字控制来加工类似不锈钢的材料。对于小于 100  $\mu\text{m}$  的部件，则需要蚀刻硅晶片或厚的光阻结构，再用 Ni 或 Ni-Co 进行电镀。而对于具有高纵横比的通道来说，则需采用 LIGA 技术进行加工。获得模具后可以采用注入成型法、热压法和模铸法将通道模式转移到芯片上。注入成型法是将聚合物熔化，然后将其注入模具中。这种方法产率高、消耗少。在热压法中，热压的工具和聚合物基质分别在真空中加热至略高于聚合物的玻璃转化温度，然后将模具和基质接触，进行热压[12]。模铸法是这三种方法中最简单的。只需将聚合物，如 PDMS，倾注到模具的表面，待其硬化后从模具表面剥离下来即可。

激光切除法是利用吸收的短激光束来使长链聚合物分子的共价键断裂，同时产生冲击波来分解聚合物片段的方法。很多商品化的聚合物，例如 PMMA、PC、PS、硝化纤维、聚乙烯基对苯二酸酯等，均可以利用该方法进行芯片加工。激光能量可以通过掩模或移动基质所在平台的方法来产生各种几何形状的微孔或微通道。形成的结构通常具有垂直的壁面和很好限定的深度，但该方法并不适用于芯片的大规模生产。此外，X-射线也可以用于聚合物芯片的加工[13]。

热复合（thermal lamination）的方法通常被用来封闭蚀刻的沟槽从而形成所需的通道[14]。采用该方法形成的通道一般会有两种不同的表面类型——三面聚合物基质和一面复合膜。如果这些材料不匹配或没有进行适当的表面修饰，流体在输送过程中有可能由于两种材料的性质不同而中断。方肇伦等[15,16]研究了紫外光化学表面改性对PDMS芯片的片基间粘接力及通道电渗流性能的影响。与等离子体表面处理方法比较，该方法设备简单，操作方便，成本低，是一种简单易行的表面处理方法。此外，他们还考察了PDMS

预聚体与固化剂间的配比、固化温度及固化时间对PDMS芯片封接强度的影响,得到了PDMS芯片封接的最佳条件芯片。Kim等[17]发展了一种利用PDMS和双面胶带加工微芯片的方法。首先向双面胶带上喷上一薄PDMS层,然后利用常规的照相印刷法在复合物上加工通道,将其与PDMS板键合。键合后双面胶可以置于任何的基质上,包括玻璃、塑料等,形成完整的微芯片。

可用于制作聚合物微流控芯片的材料很多,分离通道的表面化学性质因芯片材料不同而各不相同[18]。与玻璃芯片不同,聚合物芯片必须根据各自材料不同,采取不同的方法对内表面进行改性处理。这不仅包括表面修饰,也包括采取各种化学或者物理手段对材料本身进行改性。聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)和聚二甲氧基硅烷(PDMS)是在微流控芯片领域使用相对较多的两种聚合物材料,因此这两种材料也是聚合物芯片表面修饰研究的热点。Lin等[19]研究了聚乙烯基吡咯烷酮(PEO)对PMMA芯片的修饰作用,发现在1.5%的PEO中添加13nm的金纳米粒子能够提高分离的重现性和分辨率。Hu等[20]通过紫外光引发,经过一步反应将有机聚合物键合到PDMS表面,修饰后可以明显抑制肽的吸附。Wang等[21]利用线性聚乙酰胺(LPEI)涂层的纳米金粒子作为改性剂,对PDMS芯片通道修饰,利用修饰后的芯片电泳分离多巴胺和肾上腺素。修饰后的PDMS通道稳定性好,两周之内重现性良好。

Dang等[22]详细考察了各种传统毛细管电泳中效果较好的动态改性剂在PMMA芯片中的应用。实验发现低分子量的各种氨类化合物在PMMA芯片中的修饰效果并不明显,而亲水性的聚合物则可以明显改善被分析物的吸附,中性亲水性聚合物如PEG、HEC、HPMC等在酸性条件下可以明显改善寡聚糖在PMMA芯片中的分离。PDMS芯片表面疏水性较强,Katayama等[23,24]通过在PDMS通道内表面依次吸附多层离子化合物对其通道进行改性。将通道表面暴露在不同的带正电或负电的聚合物电解质中,表面可吸附不同的电

解质，从而具有不同的表面性质。

## 1.1.2 芯片电泳分离及检测技术

### 1.1.2.1 分离模式简介

芯片电泳技术是指在芯片的微细通道或色谱柱中，以电场为驱动力，借助于离子或分子在电迁移或者分配行为上的差异，对复杂试样中的多种组分进行快速分离分析的技术[25]。实际上是将毛细管电泳中所使用的毛细管构建在一个仅有几个或者几十个平方厘米的不同基质的芯片上，通过在通道终端施加电压实现样品的进样和快速分离分析。常规毛细管电泳的各种模式，很容易转移到微流控芯片上。毛细管电泳的各种模式，包括区带电泳、等速电泳、筛分电泳、等电聚焦、胶束电动色谱、电色谱和二维电泳等都被成功地转移到微流控芯片上。

芯片区带电泳是芯片电泳的一种最基本模式，是在微通道中直接利用被分析物的荷质比差异实现分离的一种电泳模式。由于其所用的分离介质简单，分析速度快，因此成为最早在芯片上实现的电泳分离模式，也是应用最广泛的芯片电泳模式，广泛应用于环境样品、生化样品等的分离分析中[26-28]。

等速电泳 (isotachopheresis, ITP) 是一种特殊的电泳分离技术，样品在由前导电解质和尾随电解质所组成的非连续电解质中进行电泳，其最大的特点是能将分离后的组分压缩为一个很窄的区带，从而达到柱上浓缩的目的。ITP进样体积可以比CZE大很多，具有很强的谱带压缩和分离能力。芯片等速电泳由于其强大的预富集能力，常被用来进行痕量环境污染物的分析[29,30]。近年来随着基因组学和蛋白质组学的发展，也有文献报道芯片等速电泳应用于基因[31]和蛋白质[32,33]的分离分析。

芯片筛分电泳是在微通道内冲入凝胶或者其他筛分介质（如高分子溶液），按照分子大小进行分离的一种芯片电泳分离模式。主要可以分为凝胶

筛分和无胶筛分两种。传统的凝胶柱多为聚丙烯酰胺或者葡聚糖凝胶，筛分电泳主要应用于大分子如DNA[34,35]和蛋白质[36,37]的分离分析中。

胶束电动色谱 (micellar electrokinetic chromatography, MEKC) 是一种以胶束为假固定相的电动色谱，巧妙结合了电泳技术和色谱技术的优势。在电泳缓冲溶液中加入表面活性剂，当溶液中表面活性剂浓度超过临界胶束浓度时，表面活性剂分子之间的疏水基团聚集在一起形成胶束（假固定相），溶质基于在水相和胶束相之间的分配系数不同而得到分离。芯片胶束电动色谱不仅能够分离离子化合物外，而且还能分离电中性化合物，广泛应用于环境污染、生化样品和食品添加剂等样品的分离分析[39-41]。胶束电动色谱分离中，通过改变流动相和胶束相组成可以很容易地增加分离选择性，非常适合于手性化合物的分离[42]。最近蛋白质的芯片胶束电动色谱分离也取得了新进展，汪尔康等[43]尝试将离子液体作为添加剂，利用胶束电动色谱分离蛋白质，取得了较好效果。

电色谱是在分离通道中填充或在毛细管壁涂布、键合色谱固定相，依靠电渗 (electroosmotic flow, EOF) 驱动流动相使中性和带电荷的样品分子根据它们在色谱固定相和流动相间吸附、分配平衡常数的不同和电泳速率的不同而达到分离分析的一种电分离模式。电色谱同时具备高效液相色谱的高选择性和电泳的高效性，是芯片电泳研究的一个热点[44]。芯片电色谱与毛细管电色谱相似，但是加工制作过程中，芯片电色谱可以充分利用了MEMS技术的高精确度、设计灵活等优势，突破了某些传统电色谱加工模式的束缚。目前报道的芯片电色谱的分离柱主要有填充柱、开管柱、整体柱，值得一提的是基于微加工技术的新型整体柱模式，即COMOSS(collocated monolith support structures, COMOSS)[45]，是指采用深度反应离子刻蚀技术(deep reactive ion etching, DRIE) 在芯片上制成高深宽比的多条微通道，这些微通道将芯片分割成很多个微小结构的固定相。与填充柱相比COMOSS每个微结

构都连结通道的顶和底，具有力学稳定性，位置不会随流动相移动而产生变化；通道尺寸由制作者预先设计，固定单元在整个通道中均匀有序地分布，与填充过程无关。同时，COMOSS 也与开管柱类似使用时需进行表面修饰，但它具有比开管柱大得多的表面积和更高相比。

等电聚焦是一种根据被分析物等电点不同进行分离的电泳分离模式。由于芯片等电聚焦电泳的分离通道短，施加相同的电压可以获得很高的场强，从而实现快速高效分离。因此，近年来芯片等电聚焦电泳发展十分迅速[38]。目前芯片等电聚焦的研究热点主要集中在芯片材料及其通道表面修饰、检测系统的构建、聚焦后区带的迁出和无两性电解质等电聚焦，关于芯片等电聚焦我们将在后面详细介绍。

芯片二维电泳是将两种或多种分离机理不同的电泳方法整合到同一块芯片上，进行芯片电泳分离的技术。芯片上集成的分离通道之间连接处的死体积近乎为零，而且通过简单的电压切换即可实现在线进样、分离等毛细管分离分析的基本操作，不但柱效极高，而且分离速度极快。微流控芯片的分离通道长度较短，峰容量低的缺陷也能够通过构建多维分离系统得到有效补偿。Ramsey 研究小组最早在芯片上进行二维电泳研究，取得了一系列研究成果。他们首先在芯片上实现了二维胶束电动色谱-区带电泳[46]，利用蛋白质酶解多肽验证了其分离效果。结果证明二维电泳分离能力大大高于其中的任何一维。其后，芯片二维电泳得到迅速发展，先后出现了芯片电色谱-区带电泳、无胶筛分-胶束电动色谱、等速电泳-去电泳，等电聚焦-区带电泳/凝胶电泳等多种二维芯片电泳模式。关于芯片二维电泳我们后面将详细介绍。

### 1.1.2.2 检测技术

检测器用来测定被分析物质经芯片分离或处理后有关成分的组成及其含量，是分离分析系统中的关键部分。芯片电泳的样品体积小，必须采用高灵敏度的检测方法。此外，由于其分离效率高、速度快，因此检测器必须具有

较快的响应速度。目前，芯片电泳的检测器主要有光学检测器、电化学检测器和质谱检测器三大类。

光学检测是目前微流控芯片系统使用最多的检测方法，分为荧光检测、吸光检测、化学发光检测、激光热透镜检测等。目前，在微流控芯片系统中应用的荧光检测法主要是激光诱导荧光（LIF）检测法，它是目前微流控芯片系统中最常用的检测方法，具有很高的灵敏度、良好的选择性和较宽的线性范围。LIF检测系统可分为普通激光器和半导体二极管激光器。Jiang等[47]将红二极管激光诱导荧光应用于芯片毛细管电泳，Cy-5的浓度检测限为9pM。Hata等[48]利用Hardmard转换技术控制进样，采用二极管激光诱导荧光检测，将信噪比提高了5倍。化学发光是在一些特殊的化学反应中，基态分子吸收反应中释放的化学能跃迁至激发态，处在激发态的分子以光辐射的形式将能量释放而返回基态，产生化学发光。化学发光检测法是通过检测化学发光的强度来测定被测物质的含量。化学发光检测具有很高的灵敏度，且不需要光源，仪器设备简单，易于集成化，是微流控芯片分析系统理想的检测方法之一。Liu等[49]在PDMS芯片上采用化学发光检测，浓度检测限可以达到亚微摩尔级。Qiu等[50]将氧化铟锡电极联吡啶钌电化学发光检测应用到芯片电泳，结果表明该系统具有良好的稳定性，脯氨酸的检测限可达1.2  $\mu\text{M}$ 。其它通用型光谱检测方法也有研究。Costin等[51]设计了芯片上微示差折光法检测扩散系数和分子质量（基于与分子大小的相关）系统，聚乙烯乙二醇（PEG）的检测限可达到0.9 ppm（PEG为11840 g/mol），对单糖、多糖等小分子化合物也具有很好的分辨作用。

电化学检测器具有易微型化和集成化的特点，在芯片上集成微型电极可以通过光刻等技术完成，很方便将电极集成到芯片上，将整个芯片系统微型化。根据电化学检测原理的不同，目前在微流控芯片上采用的电化学检测方法主要有安培检测法、电导检测法和电位检测法。安培检测法是根据待测物

在工作电极上发生电化学反应所产生的氧化电流和还原电流对待测物进行定量的检测方法。目前此方面的研究主要集中在微电极的选择和在芯片上的加工。Baldwin 等[52]用照相平板印刷技术法直接将芯片电泳的高电压电极和电化学检测的低电压电极全部整合到微芯片平台上。利用 Pt 电极分析多巴胺和儿茶酚,检测限可以达到 4-5  $\mu\text{M}$ 。电导检测作为通用型的离子检测方法,根据溶液中各组分对溶液电导率的贡献实现对待测组分的鉴定。由于接触式电导检测器与溶液直接接触,容易造成电极污染,并且分离电压会影响电导的检测,因此非接触式电导检测成为研究热点。Pumera 等[53]设计了一种非接触式电导检测的毛细管电泳芯片。通过 PMMA 芯片外侧加工的铝箔电极检测分离通道中溶液的阻抗。钾离子和氯离子检测限可以分别达到 2.8  $\mu\text{M}$  和 6.4  $\mu\text{M}$ 。Wang 等[54]用有机溶剂作为介质分离脂肪胺,应用非接触式电导法研究了有机溶剂的物理化学性质对迁移行为的影响。用二甲基甲酰胺作为介质,在 3000 V 电压下得到了 93680~127680 塔板数的分离效率。Laugere 等[55]通过在基片上沉积四个电极,设计了非接触式四电极电导检测器。对三种无机离子(钾、钠、锂)的分离和检测证明,四电极电导检测比二电极电导检测性能良好。在低于 10 kHz 的频率下,响应信号几乎与测量频率和背景电解液无关。非接触式电导具有其独特的优点,但是也有信噪比低的缺点。为了改善非接触性电导检测器信噪比低的缺陷,Wee 等[56]发展了一种基于连续小波变换的峰识别运算法则,使其性能有所提高。

质谱分析作为生物样品分析的重要手段,能够提供生物大分子的基本结构和定量信息。质谱的灵敏度高,而且样品需求量也很小,与芯片分离十分匹配[57]。因此,芯片电泳与质谱联用分离分析生化样品已成为芯片电泳发展的重要方向之一。芯片电泳与质谱的在线联用接口有直接喷雾和外接毛细管喷雾两种模式。Karger 等[58]设计了一个集进样、分离和质谱接口一体的微流控芯片,并将其应用于肽和蛋白质的分析。Kameoka 等[59]设计了一种新型

的电喷离子源。通过光刻和蚀刻技术将聚合物薄膜制成三角形状的喷嘴，将其键合到微流控管道的出口处上与时间飞行质谱（TOFMS）相连，应用此系统检测鸡细胞色素c，喷雾稳定，10s内连续喷雾离子电流的相对标准偏差为1.3%。Svedberg等[60]提出了在喷口处涂敷导电层的无鞘电喷技术。电喷口通过注入成型法在聚合物芯片的尾端直接加工而成。研究表明五种神经肽标准混合物的离子流响应信号的RSD范围为3.5-12%，检测限可以达到0.5 fmol/L。

#### 1.1.4 芯片电泳的应用

芯片电泳由于具有分离效率高、分析速度快、样品和试剂消耗量少、易于微型化等特点，引起了许多研究者的重视。目前，已被应用到DNA、氨基酸、肽、蛋白质、糖类生物样品以及药物、环境样品等的分离分析中[61]。

##### 1.1.4.1 核酸

最早芯片电泳的基础研究大多数的研究对象就是DNA[62]，以DNA ladder[63]和DNA降解片段为应用对象展开。目前，芯片电泳在临床诊断的基因分析中有着广泛的应用，已被成功应用到遗传性血色沉着病基因[64]、杜氏肌肉萎缩症的基因[65]和C型肝炎病毒[66]等的分离分析中。此外，芯片电泳也为高通量的DNA测序提供了有效手段[67]。Mathies等[68]设计了96通道DNA分析芯片系统，该系统在玻璃芯片上刻蚀放射状的96条通道。在芯片中央共用一个阳极贮槽，每两个样品贮槽公用一个阴极贮槽和样品废物贮槽。利用此系统在120s内可同时分离96组DNA限制性酶解产物。此后还发展了384通道的芯片[69]，进一步提高了样品的分离通量。近年来，芯片上在线PCR-电泳分离成为芯片电泳基因研究热点，Mathies研究组[70]发展了在线芯片PCR-CE系统，该系统在能够在500倍的大肠杆菌K12背景中检测出大肠杆菌O157。

#### 1.1.4.2 蛋白质、多肽

随着人类基因组计划的初步完成, 人类基因组计划进入后基因组时代。蛋白组的研究对芯片电泳提出了新的挑战[71, 72], 蛋白质和多肽的分离分析成为分析学家面临的重要课题。目前在玻璃和石英微流控芯片, 以及PDMS、PMMA、聚碳酸酯等聚合物微流控芯片上, 通过区带 (CZE)、凝胶 (CGC)、电色谱 (CEC)、等电聚焦 (IEF) 等电泳模式, 已成功实现了微流控芯片上蛋白质的分析[73-76]。蛋白质和多肽的分离分析通常需要对通道表面进行修饰[72]。林炳承[77]等用PVA修饰氧化后的PDMS芯片通道表面, 使不亲水的通道表面变成亲水, 并发现100%水解的PVA修饰后的PDMS表面吸附作用和电渗流都较88%水解的PVA修饰的和未修饰的PDMS表面小。在用涂敷了3层PVA涂层的PDMS芯片分离碱性蛋白 (溶菌酶、核糖核酸酶) 时获得了超过100000塔板/m的结果。

质谱检测法灵敏度极高并且能给出定性信息。其中电喷雾离子化质谱 (ESI-MS) 和基质辅助激光解析离子化质谱 (MALDI-MS) 能够在特定条件下保持生物大分子的非共价相互作用, 有利于蛋白质和多肽的组成和功能分析。Lion 等[78]利用芯片电泳分离蛋白质后, 用一个疏水性的聚氟化亚乙烯 (PVDF) 膜将肽和蛋白质吸附后将溶液中的盐分冲掉, 然后将肽或蛋白质送入质谱进行分析, 从而实现了脱盐功能, 使结构蛋白组的高通量分析成为可能。Ramsey[79]利用芯片电泳分离蛋白质后, 将样品迁移到喷嘴处, 电离进入质谱鉴定。利用阳离子改性剂 PolyE-323 降低了通道表面与多肽和蛋白的吸附。芯片电泳分离蛋白质的理论塔板数达到 1,000,000 塔板/米。

#### 1.1.4.3 其它应用

除上述应用外, 毛细管电泳芯片也被应用于其它生物分子、食品[80]、环境样品[81]的检测和药物的检测和筛选中。Tokuyama等[82]将集成化多层PDMS微流控芯片用于肥大细胞释放组胺过程的监测。芯片包括3层, 最上层

是细胞培养室，中间层为过滤系统，最下层为分离检测系统。所有过程都被集成在一块芯片上完成，整个分析时间只需要20 min。由于抗过敏药可抑制组胺释放，其抑制率与药物浓度相关，所以此装置已经被用于抗过敏药物的筛选。林炳承课题组[83]构建了一种集成化细胞水平的药物筛选微流控芯片装置。在已完成的浓度梯度阿霉素诱导肝癌细胞(HepG2)凋亡工作的基础上，增加细胞培养区平行的细胞池个数，使同一浓度药物对应多组不同细胞。以微流控芯片为基础的药物筛选平台，集细胞培养、浓度梯度加样、不同小分子-细胞相互作用等单元操作于一体，通过细胞毒性分析、细胞凋亡分析等筛选不同的先导化合物或抗凋亡药物。

## 第二节 基于磁性材料的芯片技术

微流控芯片是将化学和生物等领域中设计的样品制备、反应、分离、检测、等基本操作单元集成或基本集成到一块几平方厘米（甚至更小）的芯片上，由微通道形成网络，以可控的流体贯穿整个系统，用以取代常规化学或生物实验室的各种功能的技术平台。微流控芯片的最大优势在于微小尺度下多重单元技术的灵活组合和规模集成。应用磁性材料作为微流控芯片集成系统的一部分，由于其操作简单、用途广泛，越来越受到重视。磁性材料应用到微流控领域的时间并不长，但磁场不受表面电荷、溶液的 pH 值、离子浓度和温度的影响，可以不与通道内的物质接触而实现控制。随着微机电加工技术的成熟，磁场在微流控领域的应用越来越多，在分离分选、控制、捕获、传输和混合上都有着很多的运用，遍及生物、化学、物理、药物等各领域。

## 1.2.1 常用磁性材料

### 1.2.1.1 磁性微球及其制备技术

磁性微球是指含有磁性金属或金属氧化物的纳米或微米级超微结构且具有磁响应性的微球。它可以通过表面的功能基团进行各种表面的功能化修饰,因而很容易的和一些抗原或抗体结合。另外由于具有磁性,可在外磁场的作用下快速的运动和分离。磁性微球在微流控上的运用最为普遍,这些粒子的半径在几微米到几纳米之间,磁核只占有粒子体积的小部分。磁性微球不受pH等的影响,当外界有磁场存在时即会做出相应的反应,利用磁场可以方便地聚集和释放磁性微球[84],并在芯片上形成各种构型。

磁性微球由无机磁性材料与各种提供活性功能基团的材料复合制备而成,制备的方法主要有共沉淀法,共混包埋法,单体聚合法和界面沉淀法等。目前无机磁性材料的种类很多,较常用的有金属合金(Fe, Co, Ni),氧化铁( $\gamma$ - $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ),铁氧( $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ ,  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$ ),氧化铬( $\text{CrO}_2$ )和氮化铁等,其中 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ (Magnetite)是应用最多的磁性颗粒。常用提供活性功能基团的材料主要可以分为三类:天然生物大分子材料,合成高分子材料 and 无机物材料。通过共聚和表面改性,磁珠表面可被赋予多种活性功能基团,如 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{COH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 等,也可共价结合酶、细胞、抗体等生物活性物质。因为具有磁性,磁性微球可在外加磁场的作用下方便地被定位、导向和分离。作为新型功能材料,磁性微球在生物、医学(生物大分子分离、靶向药物等)、细胞学(细胞标记、细胞分选等)和环境工程(废水处理等)等领域有着广阔的应用前景。

### 1.2.1.2 其他磁性材料

有些细胞具有天然的磁性[85],如红细胞因含有顺磁性的血红蛋白呈磁性,白细胞则具有较弱的反磁性。有些细菌还可以在细胞内合成超顺磁性微球,因而能感知地磁,沿磁力线运动。目前已对其分离培养、菌体特性、基

因遗传等方面进行了大量研究。此类细菌在传感技术、临床医药、废水处理等方面也有了一定应用。

铁磁流体是将磁性粒子加入水或者有机溶剂中形成的稳定的悬浊液。这些超顺磁性粒子的平均半径在10nm左右，表面包有被膜以防止聚合。铁磁流体可以在通道内流动，形成任意的几何形状，在强磁场中仍具有流动性。磁流体通常用来在芯片内制作磁流体泵或者阀[86, 87]。

反磁性物质在磁场中向磁场最弱处运动。反磁性物质的运用相对较少。大部分的物质具有弱反磁性，如水、蛋白质、DNA、铜等，微流控领域运用最多的是聚苯乙烯微球。Kimura等[88]将铝片和铁片相互叠加后放置在1mT的均匀磁场中，得到一个固定周期的磁场，反磁性物质就会聚集在铁片上方，利用此法可以捕获聚苯乙烯微球。

在芯片上制作微磁体步骤比较繁琐，而且价格昂贵，其方法和微通道的制作类似，可通过溅射、电镀、蒸发等方法覆盖一层金属膜，将平板印刷和刻蚀等技术相结合。Ramedan等[89]对平板电磁铁的几何构型参量进行优化，制作了三种不同形状的微电磁装置：单一弯曲导体，网格状及圆形弯曲结构，分别从理论上计算磁场强度和磁场梯度的变化，并将计算机模拟和实际测量得到的数据进行比较。Siegel等[90]在硅烷化的PDMS通道内灌入熔融的金属，冷却后就得到了金属丝电磁铁，磁场强度可达2.8mT。使用这种方法可以一次性制作多个电磁铁，简单快速，并且可以使金属丝和样品流经通道非常接近。

## 1.2.2 磁性材料在微流控芯片中的应用

### 1.2.2.1 细胞分选

磁性材料常常应用于细胞的分选（sorting）[91]。利用磁场分离和操控细胞的方法，一般是使磁性微球选择性吸附在细胞表面，使细胞具有磁性后进

行操作, 也有某些细胞具有天然的磁性, 可直接利用磁场进行操控, 但也需要上述方法增加其磁性。Furdui 等[92]将表面改性的磁珠泵入微通道后, 利用外界磁铁将其固定在主通道内, 血液引入后, T 淋巴细胞吸附到磁珠上, 其他物质则随溶液被冲走, 以此可实现分离。Inglis 等[93]将微阵列磁条集成在微流控芯片上, 磁场方向与流体方向形成一定的夹角, 当流体经过时, 白细胞因为表面吸附大量磁性微球被磁场吸引而偏离流体方向, 从而从全血中分离出来。Koschwanetz 等[94]在 PDMS 芯片上直接沉积铁磁性的镍钴硼合金, 微结构呈锥形, 在芯片外放置一小型永磁体, 铁磁性物质就会被磁化, 利用该装置可捕获单个细胞。Lee 等[95]把集成电路集成到微流控体系, 利用磁场操控生物细胞。细胞固定在磁性微球表面, 悬浮在通道内, 保持生物适应性。集成电路由一系列微线圈构成, 可快速调整磁场强度和模式, 同时控制一个或多个细胞。利用细胞的天然磁性也可以分离细胞。Han 等[96]使用磁致微分离器, 可从稀释过的全血中在线分离出红细胞和白细胞, 在  $5 \mu\text{L}/\text{h}$  的流速下, 红细胞的分离效率达 93.5%, 白细胞达 97.4%。Yung 等[97]利用基于免疫磁珠的微流控系统净化血液, 能够有针对性地除去血液中的白色念珠菌。在  $20\text{mL}/\text{h}$  的流速下血液流经免疫磁珠能除去 80% 的病原体。

### 1.2.2.2 蛋白质分析

磁性微球应用于蛋白质的分析一个主要的应用方面是免疫分析。在利用磁性微球进行免疫分析过程中, 将抗原或抗体固定在磁性微球上, 加入样品经免疫反应后, 在固相磁性微球上形成免疫复合物, 外加磁场使免疫复合物固定, 然后洗涤多余的抗原或抗体, 这样就很容易的将样品中的一些干扰物质和待测定的物质快速分离开, 然后直接在磁性微球表面进行测定。Heyes 等[98]在微通道外放置小型磁铁, 在通道内形成 1-3 mm 的粒子塞, 当含有样品的抗原溶液进入通道时, 抗原就会与固定在磁珠表面的抗体结合, 随后采用荧光法进行检测。Furiani 等[99]在微通道下植入软磁性物质, 在外界偏转

的磁场作用下磁化，从而在通道内产生不均匀的磁场，表面固定有抗体的磁性微球引入后在通道内被捕获，再引入抗原与抗体结合，最后撤去磁场释放捕获的物质进行检测。Nel 等[100]在通道内形成两个磁性粒子柱，上游的磁珠表面固定蛋白酶 K，下游的磁珠表面则固定抗体，当样品溶液进入时，正常的蛋白质在上游的粒子柱处酶解，而病变的蛋白质则保留在溶液中，在经过第二个磁性粒子柱时被捕获，随后引入缓冲溶液通过改变 pH 值将其洗脱。Yang 等[101]将磁性微球应用于 CRP (C-reactive protein) 的纯化和富集。利用装填在通道内的表面修饰了 CPR-特定 DNA 适配体的磁性微球来识别和富集目标蛋白 CRP。较常规的 bench-top 法，灵敏度提高了 10 倍。Do 等[102]建立了一个基于磁性微球的微流控酶标电化学免疫分析 (ECIA) 系统。该系统利用磁性微球作为固定相，酶解产物利用计时安培分析法检测。35min 内可完成 16.4 ng/mL 的鼠 IgG 的进样和检测。

磁性微球应用于蛋白质的分离分析另一个方面是应用于蛋白质的酶解。通过将蛋白酶固定在磁性微球上，酶解蛋白并进行分离分析。用包被有褐藻酸的磁性微球固定胰蛋白酶，在芯片上酶解蛋白质，可获得很高的效率[103]。在此基础上，Le Nel[104]设计了在线的酶解-质谱鉴定芯片平台，酶解后的多肽直接进入质谱鉴定。Slovakova 等[105]利用磁性微球的自组装技术，在微通道的两侧放置磁铁，与通道呈一定夹角(30°)，使磁力线方向和液流方向平行，表面固定胰蛋白酶的磁珠引入后在磁场作用下会在通道内自组装成柱，引入的人类生长激素就可以在此进行酶解。

### 1.2.2.3 DNA 提取、PCR 扩增及检测

芯片上提取 DNA 一般先将细胞破膜，释放出的 DNA 被吸附在改性的磁珠表面，利用外界磁场将磁珠固定，细胞膜及其他物质都被溶液冲走，而 DNA 吸附在磁珠表面，最后再将 DNA 洗脱进行检测，或进行 PCR 扩增后进行检测。目前，DNA 的提取、PCR 和检测操作可集成到一块芯片上完成。chung

等[106]将磁珠固定在通道内,驱动溶液往复流动以达到充分混合,提取大肠杆菌中 DNA 的目的。Liu 等[107]设计了一种集成化的装置,将全血和磁珠混合后,目标细菌被选择性吸附到磁珠表面,随后将混合液泵入 PCR 室,冲走杂质,分离后进行 PCR 扩增和 DNA 检测。Nakagawa 等[108],使用改性的细菌磁性微球提取全血中的 DNA,PCR 扩增后检测。5  $\mu\text{L}$  的全血可以提取 165 ng DNA,洗脱约 100 ng,萃取效率 60.6%。Yeung 等[109]在磁珠上固定探针,能够只提取目标 DNA 片断,使得 DNA 提取可以有选择性地进行。Dubus 等[110]利用磁性微球预富集 DNA,再利用荧光聚合体生物传感器和荧光光度计进行检测,可快速、灵敏地测定 DNA。对于量比较大的样品,直接用表面带荧光标记 DNA 探针的磁性微球捕获目标 DNA,无需扩增和标记,直接进行检测。也可以将磁珠当作固相载体,直接将双链 DNA 固定在磁珠上进行检测。利用液滴进行 DNA 提取的方法也有报道。Lehmann 等[111]利用二维磁场控制含有磁性微球的液滴,液滴在磁场驱动下依次经过固定位点,完成吸附、清洗、洗脱等步骤,实现 DNA 提取操作。Fan 等[112]将磁珠用目标 DNA 标记后泵入具有 8 个平行通道的微流控芯片中,利用外界 600mT 的永磁铁捕获形成不到 1 mm 长的塞子,泵入互补的 DNA,使之在磁珠表面反应,随后用荧光法进行检测。捕获的 DNA 探针加热到 80 $^{\circ}\text{C}$  释放,如此循环,磁珠可重复使用 12 次。Kwakya 等[113]将一小型永磁体放在通道附近,磁珠用探针标记,实验检测了登革热病毒特殊的 RNA,相对于常规传感器具有相当高的灵敏度。Huang 等[114]设计了微流控基因合成系统。系统由 PCR 区、温控水凝胶阀、微混合器、分离纯化等部分组成。利用磁性微球作为固相萃取材料富集纯化 PCR 产物。利用此系统合成绿色荧光蛋白片段的产率与常规方法相当。

### 第三节 芯片等电聚焦

等电聚焦是根据蛋白质、肽等两性离子等电点的差异进行分离分析的电泳分离分析技术，具有很高的分离能力。芯片等电聚焦具有耗时短、样品用量少、易于自动化等诸多优点，与其他分离模式相比也具有峰容量大、能够预富集样品等特点。近年来芯片等电聚焦电泳(IEF)作为一种特殊的微分离技术得到了较大的发展[115,116]，尤其在蛋白质、抗体、临床样品等生命活性物质的分离分析方面已得到越来越广泛的应用。

#### 1.3.1 芯片材料及表面修饰

最早应用于芯片等电聚焦的是玻璃芯片，这是由于玻璃材料具有成熟的加工技术，并且其表面修饰可以借鉴石英毛细管的成熟方法。Hofmann等[117]比较了毛细管等电聚焦和玻璃芯片等电聚焦的分离效果。相较于毛细管等电聚焦，芯片等电聚焦分析速度大大提高。聚合物芯片加工简单，成本低，具有较大的实用价值，因此越来越得到研究人员的青睐。Fan等[118]利用0.3%的甲基纤维素作为动态改性剂，在PMMA芯片通道内进行芯片等电聚焦，并研究了聚焦分辨率与聚焦电压的关系，在此基础上研究了蛋白相互作用。Ivory等[119]利用0.3%的甲基纤维素作为动态改性剂，在PDMS芯片通道内，发展了多步法芯片等电聚焦技术。在宽pH梯度通道内聚焦后，将其中一部分转入窄pH梯度通道内，继续聚焦，能够有效增加芯片等电聚焦的分离度。DeVoe等[120]在聚碳酸酯芯片通道内，发展了一种动态进样的芯片等电聚焦方法。为了减小通道表面对被分析物的吸附，他们采用将芯片通道用牛血清蛋白溶液预处理的方法进行修饰，有效的降低了吸附，提高了分析灵敏度。Lee等[121]利用UV引发的嫁接反应，将环烯烃聚合物芯片通道表面用聚丙烯酰胺修饰，在芯片上等电聚焦分离了荧光标记 $\beta$ -乳球蛋白和伴清蛋白。

### 1.3.2 驱动技术

除了全柱成像检测的情况下,聚焦后的区带通常需要被迁移到检测窗口进行检测。压力驱动,电渗流驱动和化学迁移是常用的迁移方法。化学迁移是常用的方法,是指在聚焦完成后,在阳极(或阴极)电解液中加入盐或两性离子,在直流电场作用下,使聚焦区带向检测窗口方向迁移。Hofmann等[117]研究了化学迁移,压力驱动和电渗流驱动等多种方式对聚焦效果的影响。研究表明,采用电渗流驱动的“一步法”等电聚焦最容易在芯片上实现,并且分析速度快。Landers等[122]在玻璃-PDMS芯片上集成了一个微泵,将等电聚焦后的区带迁移至检测窗口。研究了迁移速率和通道长度对分离效率的影响。实验证明可以有效应用于氨基酸的等电聚焦分离。

### 1.3.3 检测技术

激光诱导荧光(LIF)检测器是芯片等电聚焦中最常用的检测器,具有很高的灵敏度、良好的选择性和较宽的线性范围。其他的光学检测方法有化学发光法[123]。Ren等采用化学发光法检测芯片等电聚焦后的样品,细胞色素c、肌球蛋白和辣根过氧化物酶的检测限分别达到 $1.2 \times 10^{-7}$ 、 $1.6 \times 10^{-7}$ 、 $1.0 \times 10^{-10}$  mol/L。等电聚焦的分离对象为蛋白质等两性分子。而质谱是蛋白质定性的最有效手段,因此质谱也是等电聚焦完成后的一种很有效的检测手段。Wen等[124]在聚碳酸酯芯片末端加工了一个锥形喷雾口,将等电聚焦后的区带输送进电喷雾质谱,三小时内被分析物信号响应值相对标准偏差小于5%。等电聚焦与其他模式的电泳方法有所不同,聚焦分离后的被分析物区带可以相对固定在某一特定位置。以上所述的检测方法需要将分析物区带迁移到检测窗口进行检测。在迁移过程中不可避免会造成区带展宽,降低分离效率。全柱扫描检测具有诸多优点:由于检测过程中样品区带不移动,因而能够极大地缩短分析时间、提高分辨率,并且可以实时监测聚焦过程,经一次实验即可找出最佳聚焦时间。最简单的全柱扫描检测装置是利用机械装置平稳移动芯

片、通过单点检测器实现。Rassi等[125]搭建了一套自动扫描系统用来监测芯片等电聚焦。9 s扫描通道一次, 5 min内可以完成一次聚焦分离。Luo等[126]利用有机发光二极管作为光源, 发展了一种芯片等电聚焦全柱检测系统, 30s内可完成一次分析, 藻红蛋白的检测限可达到 $0.6 \mu\text{g/mL}$ 。在此基础上经过改进[127], 利用发光二极管作为光源, 利用光电倍增管进行单点检测并扫描全通道, 可以进行全柱检测, 藻红蛋白的检测限可到 $38 \text{ ng/mL}$ 。Ren等[128]设计了一种PDMS芯片模块, 用来进行全柱检测芯片等电聚焦, 芯片两端采用毛细管引入两性电解质和样品, 利用双透膜将电极液和样品隔离开以降低压差的影响。该芯片模块可以直接应用于商业化的基于毛细管的等电聚焦分析仪 ( $\mu\text{CE280 analyzer}$ )。

### 1.3.4 无两性电解质芯片等电聚焦

在进行常规等电聚焦分离时, 需要将待测物和两性电解质的混合溶液充满微通道, 微通道的两端分别浸入酸性缓冲液和碱性缓冲液, 当在微通道两端施加电压时, 两性电解质中就会形成 pH 梯度, 待测组分在电场作用下迁移到 pH 与其等电点 pI 相同的区域。两性电解质的存在可能会影响后续分离或者鉴定。因此, 有人尝试不用两性电解质的等电聚焦技术。Pawliszyn 研究组[129]一直致力于热致 pH 梯度(thermally generated pH gradient)的研究, 他们在芯片锥形通道两端加上电压, 由于管径的不同, 相同的电流可以在毛细管内不同位置产生不同的温度, 沿管轴形成温度梯度, 从而导致 pH 梯度的实现, 使 pH 梯度的范围与毛细管锥度成一定比例关系。利用此 pH 梯度, 6 min内分离了人、猫和狗的血红蛋白。通过电解纯水分别产生氢离子和氢氧根离子, 利用电迁移的方法把氢离子和氢氧根离子引入通道中可以形成 pH 梯度。通过向阳极池中加入酸、向阴极池中加入碱来巩固 pH 梯度, 可以实现在纯水中分离蛋白质。Yager 研究组[130-132]进行了相关研究。他们在通道两侧镀

上金属电极, 样品和缓冲溶液在压力驱动下流经通道, 在两侧金属电极加电使电解产生氢离子和氢氧根离子, 在通道横截面方向产生 pH 梯度, 该方法可以用来进行无两性电解质等电聚焦自由流电泳。

固定化 pH 梯度整体(m-IPG)柱是一种将两性载体 Ampholine 固载到毛细管整体柱中的技术。使用 m-IPG 柱进行 CIEF 时, 不需要向缓冲溶液中加入载体两性电解质(carrier ampholytes, CAs), 因此可以避免高浓度两性电解质引起的电流增大, 影响分离效果等问题, 并且便于与 MS 在线联用。Hatch 等[133]在芯片上利用光聚合反应, 将两性载体固定在芯片通道内。考察了固定化 pH 梯度整体柱的线性梯度, 利用芯片固定化 pH 梯度整体柱分离了五种蛋白质。

#### 第四节 二维芯片电泳

多维分离[134]是近年来发展起来的一种新型复合分离技术, 将几种分离原理完全不同的分离方法加以集成, 构建成多维分离系统, 并用于对复杂样品的分离分析。Giddings[135]等提出, 多维分离系统的峰容量为每一维分离模式单独使用时峰容量的乘积。与一维分离模式相比, 多维分离可以极大的提高分辨率和峰容量, 能够便捷地调整分离选择性, 减小峰重叠, 提供更多的样品信息。

多维分离系统中不同分离模式之间的组合通常采用接口实现, 而死体积的引入往往引起额外的谱带展宽, 因此, 切换接口的设计是构建多维分离系统的关键技术。在芯片上集成的分离通道可以使通道结构的交叉或连接处的死体积近乎为零, 仅仅通过简单的电压切换即可实现自动化进样、注入、分离等毛细管分离分析的基本操作, 不但柱效极高, 而且分离速度极快, 为在微流控芯片上进行多维分离提供了便利的条件。此外, 微流控芯片的分离通道长度较短, 峰容量低的缺陷也能够通过构建多维分离系统得到有效补偿。

微流控芯片二维分离分析系统由于高效、高分辨率、高峰容量的优点，必然会得到不断发展和完善，以用于解决生命科学、环境科学等领域中复杂样品的分离分析问题。

Giddings[136]将二维系统粗略地分为连续二维系统（continuous two-dimensional operation）及耦合柱系统（coupled column assemblies）两类。“连续二维系统”将多个与第一维分离通道垂直相交的通道作为第二维分离通道，使经第一维分离后的样品能够全部、同时进入到第二维中进行分离分析。互补的连续二维系统具有揭示一个样品中复杂组分的强大能力。“柱耦合模式”中所有样品通过一个检测点，在一部分组分进入第二维分离检测时，其他样品或者在静止等待下一次二维进样，或者流向废液槽。耦合柱系统能够灵活地放大、纯化、处理样品中的指定区域。

#### 1.4.1 连续二维模式

芯片二维电泳中常见的连续二维模式为芯片等电聚焦-凝胶电泳模式，其实质是二维凝胶电泳的微型化。等电聚焦（isoelectric focusing, IEF）根据蛋白质、多肽等样品等电点的差异进行分离分析。IEF进样量可充满整个分离通道，具有良好的浓缩效应和制备能力，十分适合作为多维分离中的第一维进行样品的预富集和分离。

Whitesides[137]等借鉴传统2D-PAGE，构建了以等电聚焦为第一维，阵列通道凝胶电泳为第二维的二维芯片分离系统。利用PDMS硅橡胶体易于分离和粘合的特性，在第一维等电聚焦完成后，将第二维通道粘合上去，进行第二维凝胶电泳。采用这种连续的二维分离模式，他们利用该系统，成功分离了绿色荧光标记的碳酸酐酯酶、牛血清蛋白（BSA）和得克萨斯红标记的卵清蛋白。为了阻止扩散造成的两维之间缓冲溶液的干扰，Fan[138]等在进行IEF-PAGE时，在第二维阵列通道内光聚合反应凝胶柱进行凝胶电泳，起到了阀的作用，阻止了两维缓冲溶液之间干扰。Devoe[139,140]研究组在进行芯

片等电聚焦-凝胶电泳二维电泳分离蛋白质时,利用光聚合反应在特定区域反应上PAAm塞来降低扩散造成的两维之间缓冲溶液的干扰,控制缓冲液流动。采取上述措施,分离了大肠杆菌溶解产物,实验证明二维分离的重现性得到了很大的改善。Griebel 等[141]构建了以固相pH梯度胶条等电聚焦作为第一维的IEF-CGE二维芯片分离系统。芯片结构中含有一个固定IPG胶条的腔体,300条平行微通道阵列与该腔体垂直。在该腔体中制作了50  $\mu\text{m}$ 宽的缺口,通过电压切换将等电聚焦分离之后的样品从该缺口转移到二维分离通道。采用该系统成功地将Alexa 488标记的肌球蛋白从第一维转移到第二维进行分离分析。

## 1.4.2 柱耦合模式

### 1.4.2.1 等速电泳-区带电泳/筛分电泳

等速电泳(isotachopheresis, ITP)是一种特殊的电泳分离技术,样品在由前导电解质和尾随电解质所组成的非连续电解质中进行电泳,其最大的特点是能将分离后的组分压缩为一个很窄的区带,从而达到柱上浓缩的目的。ITP进样体积可以比CZE大的多,具有很强的谱带压缩和分离能力,因此可以作为对样品进行预浓缩和净化的手段,与其他电泳分离模式联用,构建成多维分离系统。Kaniansky[142]等在聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)芯片上进行等速电泳-毛细管区带电泳(ITP-CZE)二维分离的研究,试样先经ITP预富集,迁移率快的前导组分被引入废液通道,压缩后的待测组分切入第二条通道中进行区带电泳分离。利用电导检测法,检出了10  $\mu\text{M/L}$ 的亚硝酸盐、氟化物和磷酸盐。Williams[143]等构建的等速电泳-区带电泳(ITP-ZE)二维分离系统,与普通区带电泳相比,检测灵敏度能提高50倍。林炳承等[144]构建了芯片ITP-GE二维系统应用于蛋白质的分离分析。用该芯片二维分离系统分离了碳酸酐酶、卵清蛋白、牛血清白蛋白、伴清蛋白4种蛋白质样品,

检测限较常规 GE 提高了 40 倍。

#### 1.4.2.2 等电聚焦-区带电泳

Herr[145]在聚丙烯酰胺芯片上构建了等电聚焦-自由溶液电泳二维分离系统。第一维 IEF, 可以在一分钟内将样品富集 73 倍。在电渗流的驱动下, 聚焦后的区带迁移到二维分离通道的交叉口, 通过电压切换完成第二维进样和分离。进入第二维的流体体积为第一维流体总体积的 15% 的时, 5min 内可以完成整个二维分析, 峰容量达到 1300。二维分离系统要求第一维和第二维分离机理的正交性, 两种分离模式所需要的缓冲液往往不同。分离分析过程中, 二维之间的缓冲溶液不可避免的互相扩散干扰。因此, 如何将二维分离缓冲溶液隔绝开来是构建二维系统的重要课题。Wang[146]等在构建的芯片 IEF-ZE 二维系统中, 将微阀集成在二维分离系统的通道中, 较好地解决了这个问题。利用集成在通道中的微阀将第一维缓冲溶液和第二维缓冲溶液隔离开来, 可以方便的耦合不同分离机理的分离模式, 适合于复杂生物分子的在线质谱分析的预分离和预富集。

#### 1.4.2.3 胶束电动色谱-区带电泳

Ramsey 研究小组较早进行微芯片系统上二维分离分析研究, 取得了系列的成果。他们[46]建立的分析多肽的芯片二维分析系统中, 第一维采用胶束电动色谱, 第二维采用高速电泳。对酶解多肽的整个分析时间不超过 10min, 峰容量达到 500-1000, 证明二维分离的分辨能力大大高于其中的任何一维。在此基础上[147], 为减小因通道几何形状造成的区带展宽, 将通道的转角处设计成不对称的锥形, 在玻璃微流控装置上, 15min 内可以完成牛血清蛋白酶解产物的分离分析, 峰容量达到 4200 (第一维 110, 第二维 38)。

#### 1.4.2.4 其他模式二维电泳

芯片电色谱同毛细管电色谱相似, 不仅具有电泳的高柱效, 同时还具有

液相色谱高选择性的特点,克服了电泳选择性差和不能分离中性物质的困难。Ramsey 等[148]建立了第一维为分离通道长 25 cm 的开管电色谱,第二维为分离通道长 1.2 cm 的区带电泳的芯片二维分离系统。第一维通道内表面用十八烷基硅烷修饰,基于溶质与固定相的相互作用实现电色谱分离。

SDS-CGE与MEKC之间有一定的正交性,由于SDS-CGE与MEKC的缓冲溶液中都可以存在SDS,因而其缓冲液可以相互兼容。Shadpour等[149]构建了SDS-CGE为第一维,MEKC为第二维的芯片二维电泳分离系统。利用该系统成功分离了麦胚凝集素等10种蛋白质组成混合物。实验表明该二维分离系统正交性为77%,实际峰容量约897。由于第一维中使用的筛分介质降低了蛋白质的扩散系数,因此减小了在第二维分离进行的过程中停滞在第一维通道中的样品区带的展宽。

Tabuchi 等[150]提出了在同一芯片分离管道中依据蛋白质尺寸和等电点的不同而实现的二维分离模式。实验采用电驱动或压力驱动使样品溶液充满进样通道,再利用压力驱动将样品注入分离通道,然后在分离通道两端施加电压使得样品分离。当酸性样品溶液(pH 5.0)进入碱性缓冲溶液(pH 9.7)时,在压力下产生一个pH梯度。利用pH梯度分离了一种分子量为18 kDa的磷蛋白(pI 5.9)及其磷酸化产物(pI 5.6)。由于运行缓冲含有3%聚二甲基丙烯酰胺,随后进行芯片无胶筛分电泳,进而实现了这两种蛋白质的完全分离。

微流控芯片与其他分离方法的联用也见报道,Yang[151]等通过将毛细管与芯片微通道连接的方法,实现了毛细管高效液相色谱和芯片电泳的二维分析。对罗丹明 B 进行 150 次二维分析,其迁移时间和峰高的标准偏差分别为 3.2%和 9.8%。利用该系统,能较好地分离 FITC 标记的牛血清蛋白酶解产物。

### 1.4.3 二维芯片电泳的应用

尽管微流控芯片二维分离分析系统处在发展的阶段,但由于二维分离分析系统分离分析速度快,又具有很高的分辨能力,因此在样品预处理和复杂

样品的分离分析方便得到了很好的应用。

#### 1.4.3.1 小分子分析

Bodor[152]等设计了PMMA芯片二维分离系统进行ITP-CZE测定饮用水中的溴酸盐,进样体积达到9.2  $\mu\text{L}$ ,样品富集倍数达 $10^3$ ,溴酸盐的检测限达到20 nmol/L,即使在其他高浓度阴离子的干扰,仍能检出80 nmol/L (10ppb)的溴酸盐。林炳承[153]等构建了芯片ITP-ZE系统并将其应用于黄酮醇的分离分析,较常规芯片区带电泳灵敏度提高了32倍。

#### 1.4.3.2 大分子分析

芯片二维电泳系统构建以来,多应用于蛋白质组学的分离分析。Lee[154]等构建等电聚焦和SDS凝胶电泳二维分离分析的微流控系统进行蛋白质分离分析,在2cm $\times$ 3cm的芯片上,10min内可完成整个二维分析,峰容量达到1700。用该二维分离系统对血清蛋白、卵清蛋白、胰蛋白酶抑制剂、牛血清白蛋白和肌动蛋白组成的混合物进行了分离。Demianová等[155]设计了芯片IEF-CGE二维凝胶电泳系统并将其应用于蛋白质的分离鉴定。在二维凝胶电泳分离得到的蛋白质可以切下来,利用胰蛋白酶解后,进入质谱鉴定,可以应用于蛋白质组学分析。

### 本论文工作

本论文的研究工作主要针对微流控芯片电泳,发展高效分离和高灵敏度检测的新技术新方法。

针对微流控芯片电泳检测灵敏度低的问题,发展了基于磁性材料的芯片固相微萃取-区带电泳的方法,实现了丁胺和辛胺的芯片在线富集和分离,并将系统的检测灵敏度提高了3个数量级。

为进一步提高芯片等电聚焦的检测灵敏度和分离度,分别发展了富集进样等电聚焦和梯度电场强度等电聚焦技术,并将其应用于大肠杆菌提取蛋白质的分离分析。在此基础上,采用等电聚焦作为第一维分离模式,区带电泳作为第二维分离模式,构建了芯片二维电泳分离分析平台,并将其应用于蛋白质和多肽的分离分析。

为实现目标蛋白质的高选择性分离,制备了一种新型猪血清蛋白分子印迹毛细管整体柱,并在毛细管电色谱模式下,实现了模板蛋白质和非模板蛋白质的分离。此外,利用甲基纤维素作为动态改性剂,建立了基于聚甲基丙烯酸甲酯芯片电泳的脂肪胺类化合物的快速分析方法。

#### 参考文献

1. Manz A., Graber N., Widmer H.M., Miniaturized total chemical analysis systems: a novel concept for chemical sensing *Sens. Actuators* 1990, B1, 244-248
2. Dolnik V., Liu S., Jovanovich S., Capillary electrophoresis on microchip, *Electrophoresis* 2000, 21, 41-54
3. Lacher N. A., Garrison K. E., Martin R. S., Lunte S. M., Microchip capillary electrophoresis/Electrochemistry, *Electrophoresis* 2001, 22, 2526-2536
4. Dolnik V., Liu S., Applications of capillary electrophoresis on Microchip, *J. Sep. Sci.* 2005, 28, 1994-2009
5. 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, 177-184
6. Pu QS., Luttge R., Gardeniers H.J. G. E., van den Berg A., Comparison of capillary zone electrophoresis performance of powder-blasted and hydrogen fluoride-etched microchannels in glass, *Electrophoresis* 2003, 24, 162-171

7. Belder D, Kohler F, Ludwig M, Tolba K, Piehl N. Coating of powder-blasted channels for high-performance microchip electrophoresis. *Electrophoresis*. 2006 Aug;27(16):3277-83
8. Lu, J.J., Liu, S.R., Pu, Q.S., Replaceable cross-linked polyacrylamide for high performance separation of proteins. *J. Proteome Res.*, 2005.4(3):1012-1016
9. Gao, L., Liu, S.R., Cross-linked polyacrylamide coating for capillary isoelectric focusing. *Anal. Chem.*, 2004. 76(24): 7179-7186
10. Razunguzwa TT, Warriar M, Timperman AT. ESI-MS compatible permanent coating of glass surfaces using poly(ethylene glycol)-terminated alkoxysilanes for capillary zone electrophoretic protein separations. *Anal Chem*. 2006 Jul 1;78(13):4326-4333
11. Pumera, M., Wang, J., Grushka, E., Polsky, R., Gold nanoparticle-enhanced microchip capillary electrophoresis. *Anal. Chem.*, 2001. 73(22), 5625-5628
12. Sun X, Peeni BA, Yang W, Becerril HA, Woolley AT. Rapid prototyping of poly(methyl methacrylate) microfluidic systems using solvent imprinting and bonding. *J Chromatogr A*. 2007 Aug 31;1162(2):162-166
13. Ford SM, Davies J, Kar B, Qi SD, McWhorter S, Soper SA, Malek CK. Micromachining in plastics using X-ray lithography for the fabrication of microelectrophoresis devices. *J Biomech Eng*. 1999 Feb;121(1):13-21
14. Zhao S, Cong H, Pan T. Direct projection on dry-film photoresist (DP(2)): do-it-yourself three-dimensional polymer microfluidics. *Lab Chip*. 2009 Apr 21;9(8):1128-1132
15. 孟斐,陈恒武,方群,朱海霖,方肇伦,聚二甲基硅氧烷微流控芯片的紫外光照射表面处理研究, *高等学校化学学报* 2002,07,1264-1268
16. 叶美英,方群,殷学锋,方肇伦,聚二甲基硅氧烷基质微流控芯片封接技术的研究, *高等学校化学学报* 2002,12,2243-2246
17. Kim J, Surapaneni R, Gale BK. Rapid prototyping of microfluidic systems

- using a PDMS/polymer tape composite. *Lab Chip*. 2009 May 7;9(9):1290-3
18. Liu J, Lee ML. Permanent surface modification of polymeric capillary electrophoresis microchips for protein and peptide analysis. *Electrophoresis*. 2006 Sep;27(18):3533-46
  19. Lin YW, Huang MJ, Chang HT. Analysis of double-stranded DNA by microchip capillary electrophoresis using polymer solutions containing gold nanoparticles. *J Chromatogr A*. 2003 Oct 3;1014(1-2):47-55
  20. Hu S, Ren X, Bachman M, Sims CE, Li GP, Allbritton N. Surface modification of poly(dimethylsiloxane) microfluidic devices by ultraviolet polymer grafting. *Anal Chem*. 2002 Aug 15;74(16):4117-23
  21. Wang AJ, Xu JJ, Zhang Q, Chen HY. The use of poly(dimethylsiloxane) surface modification with gold nanoparticles for the microchip electrophoresis. *Talanta*. 2006 Mar 15;69(1):210-15
  22. Dang, F., Zhang, L., Hagiwara, H., Mishina, Y., Baba, Y., Ultrafast analysis of oligosaccharides on microchip with light-emitting diode confocal fluorescence detection. *Electrophoresis* 2003, 24, 714–721
  23. Katayama, H, Ishihama, Y, Asakawa, N, Stable Cationic Capillary Coating with Successive Multiple Ionic Polymer Layers for Capillary Electrophoresis. *Anal. Chem*. 1998, 70, 5272–77
  24. Katayama, H, Ishihama, Y, Asakawa, N, Stable Capillary Coating with Successive Multiple Ionic Polymer Layers. *Anal. Chem*. 1998, 70, 2254–60.
  25. 方肇伦等编著 微流控分析芯片 科学出版社 2003
  26. Mourzina Y, Steffen A, Kalyagin D, Carius R, Offenhäusser A., Capillary zone electrophoresis of amino acids on a hybrid poly(dimethylsiloxane)-glass chip., *Electrophoresis*. 2005 May; 26(9): 1849-60
  27. Galloway M, Stryjewski W, Henry A, Ford SM, Llopis S, McCarley RL, Soper SA., Contact conductivity detection in poly(methyl

- methacrylate)-based microfluidic devices for analysis of mono- and polyanionic molecules. *Anal Chem.* 2002 May 15;74(10):2407-15
28. Weiller BH, Ceriotti L, Shibata T, Rein D, Roberts MA, Lichtenberg J, German JB, de Rooij NF, Verpoorte E., Analysis of lipoproteins by capillary zone electrophoresis in microfluidic devices: assay development and surface roughness measurements. *Anal Chem.* 2002 Apr 1;74(7):1702-11
29. Evenhuis CJ, Guijt RM, Macka M, Haddad PR, Determination of inorganic ions using microfluidic devices. *Electrophoresis.* 2004 Nov;25(21-22):3602-24
30. Vreeland WN, Williams SJ, Barron AE, Sassi AP Tandem isotachophoresis-zone electrophoresis via base-mediated destacking for increased detection sensitivity in microfluidic systems. *Anal Chem.* 2003 Jul 1;75(13):3059-65.
31. Liu D, Shi M, Huang H, Long Z, Zhou X, Qin J, Lin B. Isotachophoresis preconcentration integrated microfluidic chip for highly sensitive genotyping of the hepatitis B virus. *Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2006 Nov 21;844(1):32-38
32. Cui H, Dutta P, Ivory CF. Isotachophoresis of proteins in a networked microfluidic chip: experiment and 2-D simulation. *Electrophoresis.* 2007 Apr;28(7):1138-45.
33. Huang, HQ, Xu, F, Dai, ZP, Lin, BC, On-line isotachophoretic preconcentration and gel electrophoretic separation of sodium dodecyl sulfate-proteins on a microchip. *Electrophoresis*, 2005, 26, 2254-60
34. Sinville R, Soper SA. High resolution DNA separations using microchip electrophoresis. *J Sep Sci.* 2007 Jul; 30(11):1714-28
35. Ugaz VM, Elms RD, Lo RC, Shaikh FA, Burns MA. Microfabricated electrophoresis systems for DNA sequencing and genotyping applications: current technology and future directions, *Philos Transact A Math Phys Eng*

- Sci. 2004 May 15;362(1818):1105-29
36. Obubuafo A, Balamurugan S, Shadpour H, Spivak D, McCarley RL, Soper SA. Poly(methyl methacrylate) microchip affinity capillary gel electrophoresis of aptamer-protein complexes for the analysis of thrombin in plasma. *Electrophoresis*. 2008 Aug;29(16):3436-45
  37. Haessler U, Kalinin Y, Swartz MA, Wu M. An agarose-based microfluidic platform with a gradient buffer for 3D chemotaxis studies. *Biomed Microdevices*. 2009 Apr 3
  38. Shimura K. Recent advances in IEF in capillary tubes and microchips. *Electrophoresis*. 2009 Jan; 30(1): 11-28
  39. Hoeman KW, Culbertson CT. A novel, environmentally friendly sodium lauryl ether sulfate-, cocamidopropyl betaine-, cocamide monoethanolamine-containing buffer for MEKC on microfluidic devices. *Electrophoresis*. 2008 Dec; 29(24):4900-05
  40. Shen S, Li Y, Wakida S, Takeda S. Determination of adrenal steroids by microfluidic chip using micellar electrokinetic chromatography. *Environ Monit Assess*. 2009 Jun;153(1-4):201-08
  41. Lee KS, Shiddiky MJ, Park SH, Park DS, Shim YB. Electrophoretic analysis of food dyes using a miniaturized microfluidic system. *Electrophoresis*. 2008 May;29(9):1910-07
  42. Zhang T, Fang Q, Du WB, Fu JL. Microfluidic picoliter-scale translational spontaneous sample introduction for high-speed capillary electrophoresis. *Anal Chem*. 2009 May 1;81(9):3693-98
  43. Xu Y, Li J, Wang E. Microchip micellar electrokinetic chromatography based on one functionalized ionic liquid and its excellent performance on proteins separation. *J Chromatogr A*. 2008 Oct 17;1207(1-2):175-80
  44. Stachowiak TB, Svec F, Fréchet JM. Chip electrochromatography. *J Chromatogr A*. 2004 Jul 30;1044(1-2):97-111

45. He B, Tait N, Regnier F., Fabrication of nanocolumns for liquid chromatography. *Anal Chem.* 1998 Sep 15;70(18):3790-97
46. Rocklin, RD, Ramsey, RS, Ramsey, JM, A microfabricated fluidic device for performing two-dimensional liquid-phase separations *Anal. Chem.* 2000, 72, 5244-5249
47. Jiang G, Attiya S, Ocvirk G, Lee WE, Harrison DJ. Red diode laser induced fluorescence detection with a confocal microscope on a microchip for capillary electrophoresis. *Biosens Bioelectron.* 2000 Jan;14(10-11):861-9
48. Hata K, Kichise Y, Kaneta T, Imasaka T. Hadamard transform microchip electrophoresis combined with diode laser fluorometry. *Anal Chem.* 2003 Apr 1;75(7):1765-68
49. Liu BF, Ozaki M, Utsumi Y, Hattori T, Terabet S. Chemiluminescence detection for a microchip capillary electrophoresis system fabricated in poly(dimethylsiloxane). *Anal Chem.* 2003 Jan 1;75(1):36-41.
50. Qiu H, Yan J, Sun X, Liu J, Cao W, Yang X, Wang E. Microchip capillary electrophoresis with an integrated indium tin oxide electrode-based electrochemiluminescence detector. *Anal Chem.* 2003 Oct 15;75(20):5435-40
51. Costin CD, Olund RK, Staggemeier BA, Torgerson AK, Synovec RE. Diffusion coefficient measurement in a microfluidic analyzer using dual-beam microscale-refractive index gradient detection. Application to on-chip molecular size determination. *J Chromatogr A.* 2003 Sep 26;1013(1-2):77-91
52. Baldwin RP, Roussel TJ Jr, Crain MM, Bathlagunda V, Jackson DJ, Gullapalli J, Conklin JA, Pai R, Naber JF, Walsh KM, Keynton RS. Fully integrated on-chip electrochemical detection for capillary electrophoresis in a microfabricated device. *Anal Chem.* 2002 Aug 1;74(15):3690-97
53. Pumera M, Wang J, Opekar F, Jelínek I, Feldman J, Löwe H, Hardt S. Contactless conductivity detector for microchip capillary electrophoresis

- Anal Chem. 2002 May 1;74(9):1968-71
54. Wang J, Pumera M. Nonaqueous electrophoresis microchip separations: conductivity detection in UV-absorbing solvents. *Anal Chem.* 2003 Jan 15;75(2):341-45
  55. Laugere F, Guijt RM, Bastemeijer J, van der Steen G, Berthold A, Baltussen E, Sarro P, van Dedem GW, Vellekoop M, Bosschet A. On-chip contactless four-electrode conductivity detection for capillary electrophoresis devices. *Anal Chem.* 2003 Jan 15;75(2):306-12
  56. Wee A, Grayden DB, Zhu Y, Petkovic-Duran K, Smith D. A continuous wavelet transform algorithm for peak detection. *Electrophoresis.* 2008 Nov;29(20):4215-25
  57. Fidalgo LM, Whyte G, Ruotolo BT, Benesch JL, Stengel F, Abell C, Robinson CV, Huck WT. Coupling microdroplet microreactors with mass spectrometry: reading the contents of single droplets online. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2009;48(20):3665-68
  58. Zhang B, Foret F, Karger BL. High-throughput microfabricated CE/ESI-MS: automated sampling from a microwell plate. *Anal Chem.* 2001 Jun 1;73(11):2675-81
  59. Kameoka J, Orth R, Ilic B, Czaplowski D, Wachs T, Craighead HG. An electrospray ionization source for integration with microfluidics. *Anal Chem.* 2002 Nov 15;74(22):5897-901
  60. Svedberg M, Pettersson A, Nilsson S, Bergquist J, Nyholm L, Nikolajeff F, Markides K. Sheathless electrospray from polymer microchips. *Anal Chem.* 2003 Aug 1;75(15):3934-40
  61. Wu D, Qin J, Lin B. Electrophoretic separations on microfluidic chips. *Chromatogr A.* 2008 Mar 14;1184(1-2):542-59
  62. Sinville R, Soper SA. High resolution DNA separations using microchip electrophoresis. *J Sep Sci.* 2007 Jul;30(11):1714-28
  63. Zhang L, Dang F, Baba Y. Stepwise gradient of linear polymer matrices in

- microchip electrophoresis for high-resolution separation of DNA. *Electrophoresis*. 2002 Jul;23(14):2341-46
64. Woolley AT, Sensabaugh GF, Mathies RA. High-speed DNA genotyping using microfabricated capillary array electrophoresis chips. *Anal Chem*. 1997 Jun 1;69(11):2181-86
65. Ferrance J, Snow K, Landers JP. Evaluation of microchip electrophoresis as a molecular diagnostic method for Duchenne muscular dystrophy. *Clin Chem*. 2002 Feb;48(2):380-83
66. Young KC, Lien HM, Lin CC, Chang TT, Lee GB, Chen SH. Microchip and capillary electrophoresis for quantitative analysis of hepatitis C virus based on RT-competitive PCR. *Talanta*. 2002 Feb 11;56(2):323-30
67. Paegel BM, Blazej RG, Mathies RA. Microfluidic devices for DNA sequencing: sample preparation and electrophoretic analysis. *Curr Opin Biotechnol*. 2003 Feb;14(1):42-50
68. Shi Y, Simpson PC, Scherer JR, Wexler D, Skibola C, Smith MT, Mathies RA. Radial capillary array electrophoresis microplate and scanner for high-performance nucleic acid analysis. *Anal Chem*. 1999 Dec 1;71(23):5354-61
69. Mathies R A, Emrich C A, Tian H, Medintz I, Berti L, Tom J, *Micro Total Analysis Systems*, (J M Ramsey and A van der Berg, Eds), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 2001:13
70. Thaitrong N, Toriello NM, Del Bueno N, Mathies RA. Polymerase chain reaction-capillary electrophoresis genetic analysis microdevice with in-line affinity capture sample injection. *Anal Chem*. 2009 Feb 15;81(4):1371-77
71. Astorga-Wells J, Vollmer S, Bergman T, Jörnvall H. Microfluidic systems and proteomics: applications of the electrocapture technology to protein and peptide analysis. *Anal Biochem*. 2005 Oct 1;345(1):10-17
72. Liu J, Lee ML. Permanent surface modification of polymeric capillary electrophoresis microchips for protein and peptide analysis. *Electrophoresis*.

- 2006 Sep;27(18):3533-46
73. Wen, J., Lin, Y., Xiang, F., Matson, D. W., Udseth, H. R., Smith, R. D., Microfabricated isoelectric focusing device for direct electrospray ionization-mass spectrometry. *Electrophoresis* 2000, 21: 191-197
  74. Yao, S., Anex, D.S., Caldwell, W. B., Arnold, D. W., Smith, K. B., Schultz, P. G., SDS capillary gel electrophoresis of proteins in microfabricated channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999, 96, 5372-5377
  75. Ericson, C., Holm, J., Ericson, T.m Hjerten, S., Electroosmosis- and pressure-driven chromatography in chips using continuous beds. *Anal. Chem.* 2000, 72, 81-87
  76. Mao, Q., Pawliszyn, J., Demonstration of isoelectric focusing on an etched quartz chip with UV absorption imaging detection. *Analyst* 1999, 124, 637-641
  77. Wu DP, Luo Y, Zhou X, Dai Z, Lin BC, Multilayer poly( vinyl alcohol) adsorbed Coating on Poly (dimethylsiloxane) Microfluidic Chips for Biopolymer Separation *Electrophoresis*, 2005, 26 (1) : 211-18
  78. Lion N, Gellon JO, Jensen H, Girault HH. On-chip protein sample desalting and preparation for direct coupling with electrospray ionization mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2003 Jun 27;1003(1-2):11-19
  79. Fonslow BR, Yates JR 3rd.Mellors JS, Gorbounov V, Ramsey RS, Ramsey JM. Fully integrated glass microfluidic device for performing high-efficiency capillary electrophoresis and electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Chem.* 2008 Sep 15;80(18):6881-87
  80. Escarpa A, González MC, López Gil MA, Crevillén AG, Hervás M, García M. Microchips for CE: breakthroughs in real-world food analysis.*Electrophoresis.* 2008 Dec;29(24):4852-61
  81. Li HF, Lin JM. Applications of microfluidic systems in environmental analysis. *Anal Bioanal Chem.* 2009 Jan; 393(2):555-67

82. Tokuyama T, Fujii S, Sato K, *et al.* Microbioassay system for antiallergic drug screening using suspension cells retaining in a poly ( dimethylsiloxane) microfluidic device. *Anal Chem* , 2005, 77 (10) : 3309 - 3314
83. Liu D, Wang LH, Zhong R, *et al.* Parallel microfluidic net works for studying cellular response to chemical modulation, *J Biotechnol*, 2007, 131 (3) : 286 - 292
84. Ju DY, Bian P., Development of Ferrite Magnetic Materials with High Strength by a Low-Temperature Sintering Method, *Science of Engineering Ceramics 111 Key Engineering Materials 2006*, 317-318: 893
85. Safarik I., Safarikova M., Use of magnetic techniques for the isolation of cells, *J. Chromatogr. B: Biomed. Appl.*, 1999, 722, 33-53
86. Eijkel JCT, VandenBerg A, Manz A, Cyclic electrophoretic and chromatographic separation methods, *Electrophoresis*, 2004, 25, 243-52
87. Atencia J., Beebe D. J., Magnetically-driven biomimetic micro Pumping using vortices, *Lab Chip*, 2004, 4, 598-602
88. Kimura T., Yamato M., Nara A., Particle trapping and undulation of a liquid surface using a microscopically modulated magnetic field, *Langmuir*, 2004, 20, 572-574
89. Qasem R., Vietor S., Daniel P., Chen Y., On-chip micro-electromagnets for magnetic-based bio-molecules separation, *J. Magn. Mater.*, 2004, 281, 150-172
90. Siegel AC, Shevkoplyas SS, Weibel DB, Bruzewicz DA, Martinez AW, Whitesides GM. Cofabrication of electromagnets and microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane). *Angew Chem Int Ed Engl.* 2006 Oct 20;45(41):6877-82
91. Mauk MG, Ziober BL, Chen Z, Thompson JA, Bau HH. Lab-on-a-chip technologies for oral-based cancer screening and diagnostics: capabilities, issues, and prospects. *Ann N Y Acad Sci.* 2007 Mar; 1098: 467-75.

92. Furdui VI, Harrison DJ. Immunomagnetic T cell capture from blood for PCR analysis using microfluidic systems. *Lab Chip*. 2004 Dec;4(6):614-8
93. Inglis D.W., Riehn R., Anstin R.H., Sturm J.C., Continuous Microfluidic Immunomagnetic Cell Separation, *Applied Physics Letters*, 2004, 85, 21, 5093-94
94. Kosehwanetz J., Carlson R., Meldrum D., Single cell capture with ferromagnetic elements grown on PDMS,  $\mu$  TAS2006, 675-77
95. Lee H., Liu Y., Westervelt R.M., Ham D., IC/Microfluidic Hybrid System for Magnetic Manipulation of Biological Cells, *IEEE Journal of solid-state Circuits*, 2006, 41, 6, 1471-80
96. Han K.H., Frazier A.B., Paramagnetic capture mode magnetophoretic microseparator for high efficiency blood cell separations, *Lab chip*, 2006, 6, 265-273
97. Yung CW, Fiering J, Mueller AJ, Ingber DE. Micromagnetic-microfluidic blood cleansing device. *Lab Chip*. 2009 May 7;9(9):1171-77
98. Hayes MA, Polson TN, Phayre AN, Garcia AA. Flow-based microimmunoassay. *Anal Chem*. 2001 Dec 15;73(24):5896-902
99. Furlani E.P., Sahoo Y., Analytical model for the magnetic field and force in a magnetophoretic microsystem, *J. Phys. D: Appl. Phys.* 2006, 39, 1724-32
100. Nel A.L., Koreeka L., Slovakova M., Mine N., Smadja C., Peyrin J.M., Viovy J.L., Tavema M., Microfluidic device based on self-organized magnetic beads: application to the on-chip analysis of the prion Protein,  $\mu$ TAS2006, 350-52
101. Yang YN, Lin HI, Wang JH, Shiesh SC, Lee GB. An integrated microfluidic system for C-reactive protein measurement. *Biosens Bioelectron*. 2009 Jun 15;24(10):3091-96
102. Do J, Ahn CH. A polymer lab-on-a-chip for magnetic immunoassay with

- on-chip sampling and detection capabilities. *Lab Chip*. 2008 Apr;8(4):542-49
103. Bílková Z, Slovákova M, Minc N, Fütterer C, Cecal R, Horák D, Benes M, Le Potier I, Krenková J, Przybylski M, Viovy JL. Functionalized magnetic micro- and nanoparticles: optimization and application to micro-chip tryptic digestion. *Electrophoresis*. 2006 May;27(9):1811-24.
104. Le Nel A, Krenkova J, Kleparnik K, Smadja C, Taverna M, Viovy JL, Foret F., On-chip tryptic digest with direct coupling to ESI-MS using magnetic particles. *Electrophoresis*. 2008 Dec;29(24):4944-47.
105. Slovakova M., Mine N., Bilkova Z., Smadja C., Faigle W., SFütterer C., Taverna M., Viovy J.L., Use of self assembled magnetic beads for on-chip protein digestion, *Lab on a chip*, 2005, 5, 935-42
106. Chung YC., Jan M.S., Lin YC., Lin J.H., Cheng W.C., Fan C.Y, Microfluidic chip for high efficiency DNA extraction, *Lab on a chip*, 2004, 4, 141-47
107. Liu RH, Yang J, Lenigk R, Bonanno J, Grodzinski P, Self-Contained, Fully Integrated Biochip for Sample Preparation, Polymerase Chain Reaction Amplification, and DNA Microarray Detection, *Anal. Chem.*, 2004, 76, 1824-32
108. Nakagawa T., Hashimoto R., Maruyama K., Thnaka T., Takeyama H., Matsunaga T., Capture and release of DNA using aminosilane-modified bacterial magnetic particles for automated detection system of single nucleotide polymorphisms, *Biotechnology and Bioengineering*, 2006, 94, 5, 862-67
109. Nakagawa T., I-Ming H., Manipulation and extraction of genomic DNA from cell lysate by functionalized magnetic Particles for lab on a chip applications, *Biosensors and Bioelectronics*, 2006, 21, 989-97
110. Dubus S., Grave J, Drohoff B.L., Nobert P., Veres T., Boudreau D.,

- PCR-Free DNA Detection Using a Magnetic Bead-Supported Polymeric Transducer and Microelectromagnetic Traps, *Anal. Chem.*, 2006, 78, 4457-64
111. Wang Z.H., Lew W.S., Bland J.A.C., Manipulation of superparamagnetic beads using on-chip current lines placed on a ferrite magnet, *Journal of Applied physics*, 2006, 99, 08P104-08P104-3
112. Fan Z.H., Mangru S., Granzow R., Heaney P., Ho W., Dong Q., Kumar R., Dynamic DNA Hybridization on a Chip Using Paramagnetic Beads, *Anal. Chem.*, 1999, 71, 4851-59
113. Kwakya S., Baeumner A., A microfluidic biosensor based on nucleic acid sequence recognition, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2003, 376, 1062-68
114. Huang MC, Ye H, Kuan YK, Li MH, Ying JY. Integrated two-step gene synthesis in a microfluidic device. *Lab Chip*. 2009 Jan 21;9(2):276-85.
115. Silvertand LH, Toraño JS, van Bennekom WP, de Jong GJ. Recent developments in capillary isoelectric focusing. *J Chromatogr A*. 2008 Sep 19;1204(2):157-70.
116. Sommer GJ, Hatch AV., IEF in microfluidic devices, *Electrophoresis*. 2009 Mar;30(5):742-57.
117. Hofmann O., Che D., Cruickshank K. A., Müller U. R. Adaptation of Capillary Isoelectric Focusing to Microchannels on a Glass Chip *Anal. Chem.* 1999, 71, 678-686
118. Tan, W., Fan, Z. H., Qiu, C. X., Ricco, A. J., Gibbons, I., Miniaturized capillary isoelectric focusing in plastic microfluidic devices, *Electrophoresis* 2002, 23, 3638-3645
119. Cui H, Horiuchi K, Dutta P, Ivory CF., Isoelectric Focusing in a Poly(dimethylsiloxane) Microfluidic Chip *Anal. Chem.* 2005, 77, 1303-1309
120. Li, Y., DeVoe, D. L., Lee, C. S., Dynamic analyte introduction and focusing in plastic microfluidic devices for proteomic analysis, *Electrophoresis* 2003,

- 24, 193-199
- 121.Li C, Yang Y, Craighead HG, Lee KH., Isoelectric focusing in cyclic olefin copolymer microfluidic channels coated by polyacrylamide using a UV photografting method *Electrophoresis* 2005, 26, 1800-1806
- 122.Christelle Guillo,a James M. Karlinseya and James P. Landers On-chip pumping for pressure mobilization of the focused zones following microchip isoelectric focusing *Lab Chip*, 2007, 7, 112-118
- 123.Huang X., Ren J., On-line chemiluminescence detection for isoelectric focusing of heme proteins on microchips *Electrophoresis* 2005, 26, 3595-3601
- 124.Wen J., Lin Y., Xiang F., Matson D.W., Udseth H.R., Smith R.D., Microfabricated isoelectric focusing device for direct electrospray ionization-mass spectrometry *Electrophoresis* 2000,21,191-197
- 125.Raisi F., Belgrader P., Borkholder D. A. Herr A.E., Kintz G.J., Pourhamadi F., Taylor Michael T., Northrup M. A., Microchip isoelectric focusing using a miniature scanning detection system *Electrophoresis* 2001, 22, 2291-2295
- 126.Yao B, Yang H, Liang Q, Luo G, Wang L, Ren K, Gao Y, Wang Y, Qiu Y. High-Speed, Whole-Column Fluorescence Imaging Detection for Isoelectric Focusing on a Microchip Using an Organic Light Emitting Diode as Light Source *Anal. Chem.* 2006, 78, 5845-5850
- 127.Ren K, Liang Q, Yao B, Luo G, Wang L, Gao Y, Wang Y, Qiu Y. Whole column fluorescence imaging on a microchip by using a programmed organic light emitting diode array as a spatial-scanning light source and a single photomultiplier tube as detector. *Lab Chip*. 2007 Nov;7(11):1574-80
- 128.Ou J, Glawdel T, Samy R, Wang S, Liu Z, Ren CL, Pawliszyn J., Integration of Dialysis Membranes into a Poly(dimethylsiloxane) Microfluidic Chip for Isoelectric Focusing of Proteins Using Whole-Channel Imaging Detection *Anal. Chem.* 2008, 80, 7401-7407
- 129.Huang T, Pawliszyn J. Microfabrication of a tapered channel for isoelectric

- focusing with thermally generated pH gradient. *Electrophoresis*. 2002 Oct;23(20):3504-10
130. Macounová, K., Cabrera, C. R., Holl, M. R., Yager, P., Generation of natural pH gradients in microfluidic channels for use in isoelectric focusing, *Anal. Chem.* 2000, 72, 3745–3751.
131. Cabrera, C. R., Finlayson, B., Yager, P., Formation of natural pH gradients in a microfluidic device under flow conditions: model and experimental validation., *Anal. Chem.* 2001, 73, 658–666.
132. Macounová, K., Cabrera, C. R., Yager, P., Concentration and separation of proteins in microfluidic channels on the basis of transverse IEF, *Anal. Chem.* 2001, 73, 1627–1633.
133. Sommer GJ, Singh AK, Hatch AV. On-chip isoelectric focusing using photopolymerized immobilized pH gradients. *Anal Chem.* 2008 May 1;80(9):3327-33.
134. 张玉奎, 张维冰, 张丽华, 多维立体分离分析技术面临的挑战性问题及对应策略, *色谱*, 2003, 21 (4), 299-302
135. Giddings J C. John Wiley and Sons, New York, 1991.112-141
136. Giddings, J. C., Concepts and comparisons in multidimensional separation. *J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.* 1987, 10: 319-323
137. Chen X, Wu H, Mao C, Whitesides GM. A prototype two-dimensional capillary electrophoresis system fabricated in poly(dimethylsiloxane). *Anal Chem.* 2002 Apr 15;74(8):1772-78
138. Das C, Zhang J, Denslow ND, Fan ZH. Integration of isoelectric focusing with multi-channel gel electrophoresis by using microfluidic pseudo-valves. *Lab Chip.* 2007 Dec;7(12):1806-12
139. Liu J, Yang S, Lee CS, DeVoe DL. Polyacrylamide gel plugs enabling 2-D microfluidic protein separations via isoelectric focusing and multiplexed sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis. *Electrophoresis.* 2008

- Jun;29(11):2241-50
140. Yang S, Liu J, Lee CS, Devoe DL. Microfluidic 2-D PAGE using multifunctional in situ polyacrylamide gels and discontinuous buffers. *Lab Chip*. 2009 Feb 21;9(4):592-99
141. Griebel A, Rund S, Schönfeld F, Dörner W, Konrad R, Hardt S. Integrated polymer chip for two-dimensional capillary gel electrophoresis. *Lab Chip*. 2004 Feb;4(1):18-23
142. Kaniansky D, Masar M, Bielicikova J, Ivanyi F, Eisenbeiss F, Stanislawski B, Grass B, Neyer A, Johnck M., Capillary electrophoresis separations on a planar chip with the column-coupling configuration of the separation channels *Anal Chem*. 2000 Aug 1;72(15):3596-604
143. Vreeland WN, Williams SJ, Barron AE, Sassi AP Tandem isotachopheresis-zone electrophoresis via base-mediated destacking for increased detection sensitivity in microfluidic systems. *Anal Chem*. 2003 Jul 1;75(13):3059-65
144. Huang H, Xu F, Dai Z, Lin B. On-line isotachopheretic preconcentration and gel electrophoretic separation of sodium dodecyl sulfate-proteins on a microchip. *Electrophoresis*. 2005 Jun;26(11):2254-60
145. Herr AE, Molho JI, Drouvalakis KA, Mikkelsen JC, Utz PJ, Santiago JG, Kenny TW. On-chip coupling of isoelectric focusing and free solution electrophoresis for multidimensional separations. *Anal Chem*. 2003 Mar 1;75(5):1180-87
146. Wang Y.C., Choi M.H., Han J., Two-Dimensional Protein Separation with Advanced Sample and Buffer Isolation Using Microfluidic Valves, *Anal. Chem.* 2004, 76, 4426-4431
147. Ramsey J.D., Jacobson S.C., Culbertson C.T., and Ramsey J. M., High-Efficiency, Two-Dimensional Separations of Protein Digests on Microfluidic Devices *Anal. Chem.* 2003, 75, 3758-3764
148. Gottschlich N., Jacobson S.C., Culbertson C.T., Ramsey J. M.,

- Two-Dimensional Electrochromatography/Capillary Electrophoresis on a Microchip *Anal. Chem.* 2001, 73, 2669-2674
149. Shadpour H, Soper S A., Two-dimensional electrophoretic separation of proteins using poly(methyl methacrylate) microchips, *Anal. Chem.*, 2006, 78 (11): 3519-3527
150. Tabuchi M, Kuramitsu Y, Nakamura K, Baba Y. A 15-s protein separation employing hydrodynamic force on a microchip. *Anal Chem.* 2003 Aug 1;75(15):3799-805
151. Yang X, Zhang X, Li A, Zhu S, Huang Y. Comprehensive two-dimensional separations based on capillary high-performance liquid chromatography and microchip electrophoresis. *Electrophoresis.* 2003 May;24(9):1451-57
152. Bodor R, Kaniansky D, Masár M, Silleová K, Stanislawski B. Determination of bromate in drinking water by zone electrophoresis-isotachopheresis on a column-coupling chip with conductivity detection. *Electrophoresis.* 2002 Oct;23(20):3630-37
153. Ma B, Zhou X, Wang G, Huang H, Dai Z, Qin J, Lin B. Integrated isotachopheretic preconcentration with zone electrophoresis separation on a quartz microchip for UV detection of flavonoids. *Electrophoresis.* 2006 Dec;27(24):4904-09
154. Li Y, Buch JS, Rosenberger F, DeVoe DL, Lee CS. Integration of isoelectric focusing with parallel sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis for multidimensional protein separations in a plastic microfluidic network. *Anal Chem.* 2004 Feb 1;76(3):742-48
155. Zuzana Demianová, Masahiko Shimmo, Eemeli Pöysä, Sami Franssila, Marc Baumann., Toward an integrated microchip sized 2-D polyacrylamide slab gel electrophoresis device for proteomic analysis *Electrophoresis* 2007, 28, 422-428

## 第二章 基于磁性材料的芯片在线富集-电泳技术

微流控芯片是将化学和生物等领域中涉及的样品制备、反应、分离、检测等基本操作单元集成或基本集成到一块几平方厘米（甚至更小）的芯片上，由微通道形成网络，以可控的流体贯穿整个系统，用以取代常规化学或生物实验室的各种功能的技术平台[1]。微流控芯片的最大优势在于微小尺度下多重单元技术的灵活组合和规模集成。

在芯片电泳过程中，由于样品进样量少，且检测光程短，因此检测灵敏度较低。尽管开发具有高检测灵敏度的检测器是行之有效的办法，但通常会增加设备的体积和成本，影响其推广范围。因此，近年来发展新型样品在线富集技术受到人们的关注。

微流控芯片的样品预富集方法主要包括基于电驱动的等速电泳[2]、等电聚焦[3]、场放大[4]等技术和基于吸附作用的膜富集[5]、固相萃取[6]等。其中，固相萃取富集技术是利用固体填料将液体样品中的目标化合物吸附，使之与样品基质及干扰化合物分离，然后再用洗脱液洗脱，从而达到分离或者富集目标化合物的目的。固相萃取作为试样前处理的有效方法已被广泛应用于微流控芯片[7]中。Broyles等[8]在通道内壁涂敷的C18，将其作为固相萃取的吸附剂和电色谱分离的固定相，初步实现了固相萃取和电色谱分离分析的集成。然而，由于受比表面积的限制，固相萃取的柱容量低，因此富集倍数有限。尽管采用填充或通道内原位聚合固定相作为固相萃取材料[9,10]可以有效提高富集能力，但材料的填充和制备过程比较复杂。

本章在构建微流控芯片电泳分析平台的基础上，研制了新型磁性材料，并在芯片上实现了样品在线富集和电泳分离的集成，并将其用于脂肪胺的分析。

## 第一节 芯片电泳系统构建

### 2.1.1 引言

近年来随着芯片微加工技术的日益成熟,微流控芯片得到了迅速发展。利用微全分析技术( $\mu$ -TAS)可以将实验室中进行的各种传统化学操作过程,如样品预处理、混合、萃取、反应、分离和检测等集成在同一个微型装置中进行。自90年代初诞生以来, $\mu$ -TAS技术已被成功用于分离科学的多个应用领域[11-14],成为一个极为活跃的研究热点。

微流控芯片电泳中的关键要素是分析平台和芯片。分析平台由电场驱动、检测和信号收集三部分组成。其中,高压电源产生的电场力是芯片电泳的主要驱动力之一;激光诱导荧光检测是芯片电泳分析中普遍采用的检测技术;信号收集主要通过CCD或者光电转化系统来实现。芯片的材质有很多种,其中玻璃芯片不仅具有优异的电渗、光学和表面性质,而且蚀刻加工技术和表面改性的化学方法均比较成熟。此外,还可将各种毛细管电泳的分离方法和策略直接转移到芯片。因此,玻璃芯片在 $\mu$ -TAS领域中应用十分广泛。

为满足微流控芯片研究的需要,系统优化了玻璃芯片的蚀刻条件;以荧光素钠为样品,对自行搭建的微流控芯片电泳分析平台进行了评价。

### 2.1.2 实验部分

#### 2.1.2.1 仪器与试剂

微流控芯片激光诱导荧光检测系统购自浙江大学微分析系统研究所;XCDY微流控芯片智能高压电源购自山东师范大学化学系;JKG-2A光刻机购自上海学泽光学机械光学有限公司;DZF-6021型真空干燥箱和DKZ-2型恒温振荡箱购自上海精宏实验设备有限公司;Z512B型台式钻床购自杭州西湖台钻有限公司;SRJX-3-9型箱式电炉和KSY-6D-16A型程序温度控制器购

自沈阳市电炉厂；EC2000 色谱数据处理工作站购自大连依利特科学仪器有限公司。

SG-2506 铬版玻璃购自长沙韶光铬版有限公司；氢氟酸购自大连化学试剂有限公司；硝酸铈铵购自天津市科密欧化学试剂有限公司；硝酸购自沈阳化学试剂厂；盐酸购自公主岭市化学试剂厂；丙酮购自沈阳化学试剂厂；氢氧化钠购自天津市科密欧化学试剂有限公司；高氯酸购自天津鑫源化工有限公司；氟化铵购自北京市化工技术有限公司；所用水为 Milli-Q 纯净水，其他试剂皆为分析纯。

### 2.1.2.2 玻璃芯片的制作过程

采用标准光刻技术制作玻璃芯片，并在文献[15]基础上加以改进。首先利用画图软件设计芯片构型。利用高分辨打印机制出掩膜后，将掩膜上设计的图案通过曝光成像转移到铬版玻璃表面涂敷的光敏胶上。再通过显影、固胶、脱胶、硝酸铈铵和高氯酸除铬、化学蚀刻等步骤，制做芯片通道。然后利用钻床在玻璃基片上钻出适当直径的孔作为芯片储液池。将蚀刻好的芯片基片和盖片清洗干净，采用室温键合技术将两者封接，制成芯片。最后，将封接后的芯片置于电炉中通过程序升温加固其键合程度。

### 2.1.2.3 玻璃芯片通道的蚀刻

以 HF 为主要蚀刻剂，采用湿法蚀刻技术形成芯片微通道。将曝光后的铬版玻璃除去保护层，在流水中冲洗干净。用胶将芯片除通道外其余地方保护后，将芯片浸入盛蚀刻液的塑料器皿中，在振荡恒温器中恒温 30°C 蚀刻。通过选用不同的辅助蚀刻剂，并调配不同配比的蚀刻液来调节刻蚀通道的尺寸。

### 2.1.2.4 芯片平台构建

构建的用于微流控芯片电泳的平台主要由三部分组成（如图 2-1 示）：微流控芯片电源系统（A）、数据处理系统（B）和激光诱导荧光光学检测系统（C）。其中 1 为计算机，2 为微流控芯片电源，3 为微流控芯片，4 为模数转换器，5 为目镜，可以直接观察芯片通道，6 为光电倍增管，7 为分光器，8 和 9 为反射镜，10 为元二色镜，11 为目镜，12 为激光器。

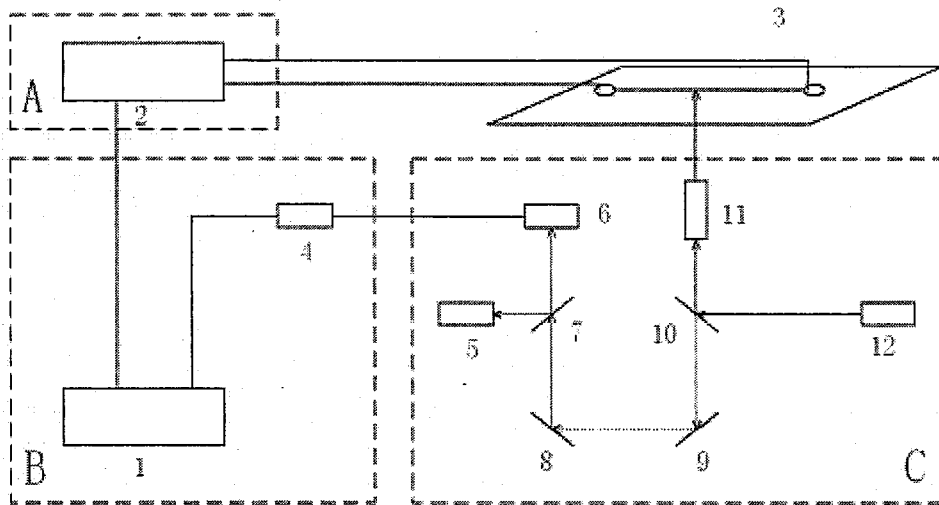


图 2-1 芯片电泳装置简图

Figure 2-1 Schematic diagram of microchip electrophoresis apparatus

在激光诱导光学检测系统中，激光波长为 473 nm，检测波长为 520 nm。激光器 12 发射出的激光通过元二色镜 10 反射至目镜 11，经过目镜聚焦后照射于芯片通道 3 内。样品发出的荧光经由目镜，透过元二色镜，两次反射后进入分光器 7，一部分荧光进入物镜 5，可以直接观察；另一部分进入光电倍增管 6 转换为电信号后，通过模数转换器 4 在数据处理软件上显示数据信号。

微流控芯片电源系统由计算机控制，可智能完成实验参数设定、输出及控。可输出六路高压，每路电压输出范围为 0-8000v，且具有悬浮接地功能。

### 2.1.3 结果与讨论

#### 2.1.3.1 玻璃芯片蚀刻

玻璃的蚀刻效果主要与蚀刻液、添加剂、蚀刻温度等参数有关。HF 是普遍采用的玻璃蚀刻剂。NH<sub>4</sub>F 和 HNO<sub>3</sub> 是蚀刻液常见的添加剂[16-17]。在 HF 中添加 NH<sub>4</sub>F 的主要目的是增加蚀刻液中有效反应离子 F<sup>-</sup> 的量，以提高蚀刻速度。添加 HNO<sub>3</sub> 的主要目的是利用 HNO<sub>3</sub> 溶解 HF 与玻璃反应后产生的难溶物，提高蚀刻质量，确保蚀刻平面光滑。

考察了具有不同配比的蚀刻液对芯片蚀刻速度和蚀刻质量的影响（表 2-1）。实验结果证明，采用 NH<sub>4</sub>F 作为添加剂可以有效增加蚀刻液的蚀刻速度，但蚀刻的通道表面较为粗糙。采用 HNO<sub>3</sub> 作为添加剂的蚀刻液所蚀刻得到的通道表面光滑，但蚀刻速度慢。在本实验中，最终选择浓度比为 1: 1 的 HF 和 HNO<sub>3</sub> 蚀刻液。

表 2-1 不同配比蚀刻液的蚀刻效果

Table 2-1 Effect of etching buffer composition on microchip quality

蚀刻液	配比 (mol/L)	横向蚀刻速度 ( $\mu\text{m}/\text{min}$ )	通道表面
HF: NH <sub>4</sub> F	1: 1	3	粗糙
HF: NH <sub>4</sub> F: HNO <sub>3</sub>	1: 0.5: 0.75	1.7	较粗糙
HF: HNO <sub>3</sub>	1: 0.75	1.2	较平滑
HF: HNO <sub>3</sub>	1: 1	1.1	较平滑

注：蚀刻温度为 40 °C；蚀刻时间 30 min

此外,还考察了温度对蚀刻速度和蚀刻质量的影响(表2)。实验证明,提高温度能够有效增加蚀刻速度,但同时也会对蚀刻质量造成负面影响;低温有利于蚀刻得到光滑的通道表面,但蚀刻速度慢,效率低。综合考虑蚀刻时间和蚀刻质量,选择30℃作为芯片通道蚀刻温度。

表2 温度对蚀刻的影响

Table 2-1 Effect of etching temperature on microchip quality

温度(°C)	横向蚀刻速度(μm/min)	通道表面
40	1.1	较平滑
30	1	平滑
0	0.35	平滑

注: HF 和 HNO<sub>3</sub> 浓度均为 1mol/L; 蚀刻时间 30 min。

### 2.1.3.2 芯片平台性能考察

以荧光素钠为样品,在自制的玻璃芯片上(100 μm 宽,40 μm 深,进样通道长度为 10 mm,分离通道和有效分离长度分别为 45 mm 和 5 mm),对该平台的芯片电泳性能进行了评价。进样电压和时间分别为 500V/cm 和 30 s;分离电压为 500 V/cm。如图 2-2 所示,在信噪比(S/N)大于 3 的情况下,荧光染料的检测限约为  $2.7 \times 10^{-8}$  mol/L。基本上可以满足微流控芯片电泳分析要求。

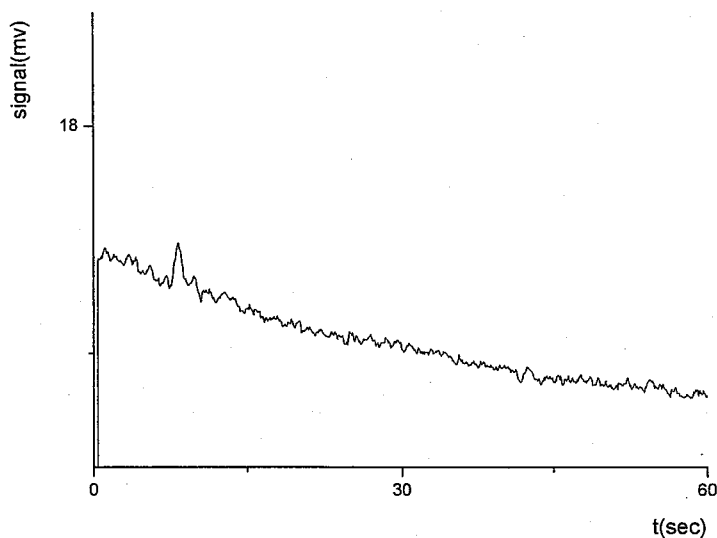


图 2-2 荧光素钠的微流控芯片电泳谱图

Figure 2-2 Electrophoregram of fluorescein by microchip electrophoresis

Experimental conditions: buffer: 20mmol/L sodium phosphate (pH 8.0); sampling and separation electric field strength: 500V/cm; sample:  $2.7 \times 10^{-8}$  mol/L fluorescein.

## 第二节 基于磁性材料的芯片在线富集-电泳分离

### 2.2.1 引言

目前，在芯片上集成固相萃取柱主要有以下三种方式：开管式[8, 18]、填充柱[9]和原位聚合整体柱[10]。其中，开管式 SPE 柱的制备最简单，但由于涂层的有效面积有限，因此萃取容量较低。在芯片中填充固相颗粒，可以显著提高萃取容量，成本也相对低廉，但由于涉及到围堰等结构的制作，使加工工艺变得复杂。在芯片通道中制作整体柱进行固相萃取，虽然可以避免

颗粒填充所需的围堰等复杂结构,但整体材料制备的重现性和稳定性有待进一步提高。

磁性纳米粒子是指含有磁性金属或金属氧化物的纳米或微米级超微结构且具有磁响应性的微粒[19]。因此,在芯片微通道内采用磁性纳米粒子作为富集材料,可利用磁场方便地控制磁性纳米粒子的芯片微通道中的位置,避免围堰或柱塞的制备。此外,因磁性材料的性能不受上样和洗脱等操作条件的影响,可以通过选择高强度的洗脱条件确保样品完全洗脱。目前在芯片上利用磁性纳米粒子作为富集材料,通常是用于抗原抗体的免疫分析[20]和DNA的提取[21]。痕量组分在线富集方面的工作尚未见报道。

本节研制了一种表面包覆有机无机杂化层的新型介孔磁性纳米粒子,并通过优化上样和洗脱条件,实现了脂肪胺的在线富集和区带电泳分离的联用。

## 2.2.2 实验部分

### 2.2.2.1 仪器与试剂

微流控芯片激光诱导荧光检测系统购自浙江大学微分析系统研究所;XCDY 微流控芯片智能高压电源购自山东师范大学化学系;JKG-2A 光刻机购自上海学泽光学机械光学有限公司;DZF-6021 型真空干燥箱和 DKZ-2 型恒温振荡箱购自上海精宏实验设备有限公司;Z512B 型台式钻床购自杭州西湖台钻有限公司;SRJX-3-9 型箱式电炉和 KSY-6D-16A 型程序温度控制器购自沈阳市电炉厂;EC2000 色谱数据处理工作站购自大连依利特科学仪器有限公司。

异硫氰酸荧光素(FITC)和脂肪胺购自北京百灵威化学试剂公司,无水乙酸钠、氯化铁、氨水(25%)和乙二醇购自天津市科密欧化学试剂有限公司;乙醇购自盘锦天源药业有限公司;正硅酸乙酯(四乙氧基硅烷 TEOS 95%)购自 ACROS organics;三乙氧基辛烷基硅烷(C8-TEOS)购自 Sigma

(St.Louis, Missouri); 十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB) 购自北京化学试剂公司; 所用水为 Milli-Q 纯净水, 其他试剂皆为分析纯。

### 2.2.2.2 磁性介孔杂化材料的制备

磁性介孔杂化材料的制备主要分为三个步骤: (1) 四氧化三铁颗粒的制备; (2) 颗粒表面硅层的包被; (3) 介孔杂化层的制备。首先将 2.7 g 的氯化高铁溶解于 100 mL 的乙二醇中, 搅拌均匀后加入 7.2 g 的无水乙酸钠。磁力搅拌 0.5 h, 形成透明黄色液体。超声混匀后转至反应釜内, 于 200 °C 下反应 6 h。冷却至室温后, 分别用乙醇和水超声清洗三次, 并将颗粒悬浮在乙醇中, 超声形成悬浊液。然后将 100 g 乙醇、30 g 水和 9 g 氨水放入圆底烧瓶中摇匀, 加入磁性颗粒 100 mg, 超声 10 min。在 40 °C 磁力搅拌下缓慢滴加入 1 g 正硅酸乙酯, 搅拌反应 15 h。反应结束后, 分别用乙醇和水进行超声清洗。然后, 将颗粒悬浮在 20 mL 乙醇中, 形成约 5 mg/mL 的悬浮液。将  $\text{Fe}_3\text{O}_4 \cdot n\text{SiO}_2$  颗粒 (~30 mg) 分散于 65 mL 水中, 超声后加入 0.37 g CTAB、60 mL 乙醇、80 mL 水和 1 mL 氨水, 搅拌 0.5 h 后, 加入 0.6 g TEOS 与 0.4 g C8-TEOS 的混合物, 在室温下搅拌 20 h。反应完成后, 乙醇超声清洗四次。最后将颗粒悬浮于 50 mL 丙酮中, 并在 70 °C 下回流 24 h 萃取出 CTAB。最后用乙醇超声清洗三次, 并在乙醇中悬浮保存。

### 2.2.2.3 固相萃取柱的填充

芯片通道结构如图 2-3 所示, 液槽 1 和液槽 3 到交叉口的距离皆为 5 mm, 液槽 2 到交叉口的距离为 40 mm。液槽 3 处通道末端设计为锥形, 以便于磁性材料的填充。锥形通道长度和深度分别为 4 mm 和 100  $\mu\text{m}$ ; 最宽处为 1 mm; 其余通道的宽度和深度分别为 80  $\mu\text{m}$  和 30  $\mu\text{m}$ 。

首先将乙醇中的磁性颗粒超声, 使之悬浮均匀。将磁场加到欲填充 SPE 柱的位置后向芯片液槽 3 中加入悬浮的磁性颗粒, 并慢慢将磁性颗粒压入通

道中。磁性颗粒受磁场作用迁移至指定位置，形成 SPE 微柱，用于样品的预富集。

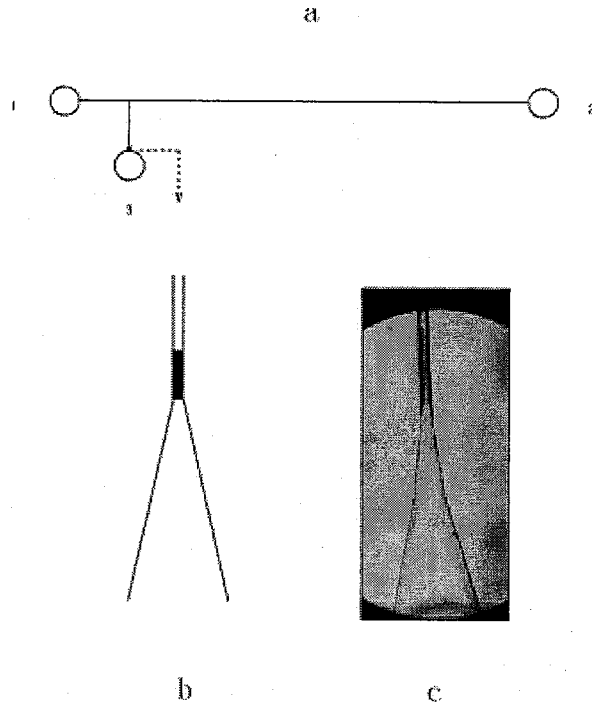


图 2-3 带有 SPE 结构的电泳芯片结构示意图

a 为芯片通道结构；b c 为 SPE 填充柱示意图和实物照片

Figure 2-3 Schematic diagram of integrated SPE and electrophoresis microchip

#### 2.2.2.4 样品的富集与洗脱

如图 2-3 示，首先将样品加入液槽 3 中，通过压力使其流经 SPE 柱。去除液槽中残余的样品后，分别用水和缓冲溶液将 SPE 柱和通道冲洗干净。将缓冲溶液加到芯片液槽 3 中，加压使之充满通道，然后分别在三个液槽中加入缓冲溶液。利用  $90\mu\text{m}$  外径毛细管插入锥形通道中，通过压力将乙腈引入到锥形通道与分离通道交界处。在液槽 3 和液槽 2 上施加电压，通过电渗流驱动乙腈将被吸附的样品洗脱。

### 2.2.2.5 在线固相萃取富集-区带电泳

富集后的样品被洗脱后，在液槽 3 和 2 上施加电压，将样品驱动到纵向通道和横向通道的交叉口处。然后切换电压，在液槽 1 和 2 上施加电压，将洗脱后的富集样品分离。

表 2-3 洗脱与分离时施加的电压

Table 2-3 Applied voltages for elution and separation

	液槽 1	液槽 2	液槽 3
进样	Floating	Grounded	HV
电泳	HV	Grounded	Floating

## 2.2.3 结果与讨论

### 2.2.3.1 洗脱液引入方法

为获得较好的富集效率，富集在 SPE 材料上的样品应该采用强洗脱剂进行洗脱，以避免洗脱能力不足造成样品残留或者洗脱剂体积过大引起的富集后的样品再次稀释。此外，为避免强洗脱剂对会影响后续的芯片电泳分离缓冲的影响，在本实验中，将外径为 90  $\mu\text{m}$  的毛细管插至通道宽度为 100  $\mu\text{m}$  的 SPE 柱头，并引入洗脱剂，以便能够有效控制洗脱剂的引入量。

考察了利用毛细管插入锥形宽通道和分离通道交界处引入乙腈洗脱液的可行性。由图 2-4 结果可以看出，利用该方法可以有效地引入洗脱溶剂，将吸附在磁性颗粒材料表面的丁胺洗脱，并在芯片电泳系统中得到检测。

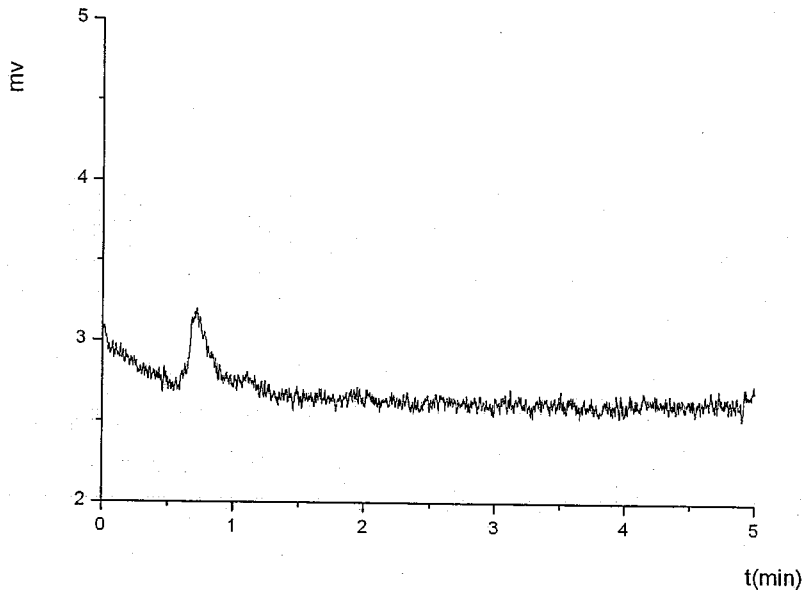


图 2-4 经毛细管引入乙腈洗脱的丁胺的芯片电泳图

Figure 2-4 Electropherogram of butylamine eluted by ACN via capillary  
Experimental conditions: Buffer: 10mmol/L PBS (pH 5.1); separation voltage:  
300 V/cm; sample: Butylamine 1 $\mu$ g/mL, 0.5 nL/s 30s

### 2.2.3.2 洗脱液量对洗脱效果的影响

为获得样品的最佳洗脱和分离效果，需对洗脱液乙腈的量进行优化。乙腈太少不能保证样品全部洗脱，而过多则会影响后续的电泳分离。如图 2-5 显示了不同乙腈的量对样品洗脱效果的影响。结果表明，在保证充分洗脱丁胺的情况下，应选择的乙腈量为以 25 nL (2.5 nL/s 的流速洗脱 10 s)。

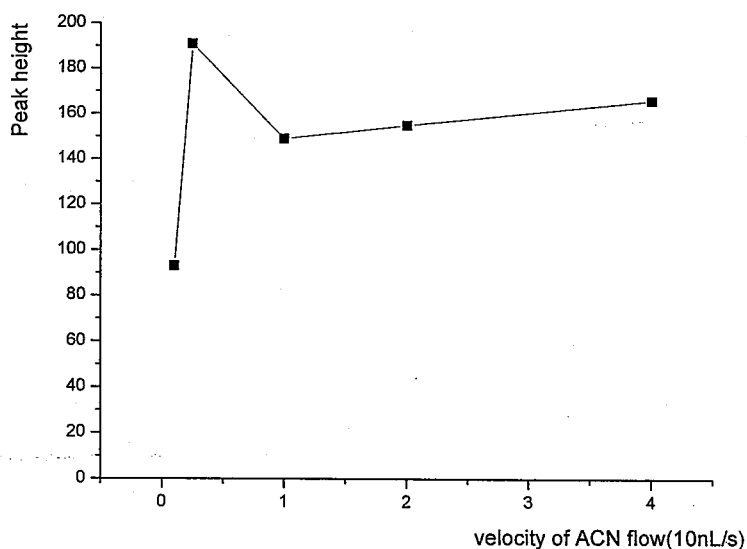


图 2-5 乙腈量对洗脱丁胺峰高的影响

Figure 2-5 Effect of acetonitrile elution volume on peak height of butylamine  
Experimental conditions: Buffer: 10mmol/L PBS (pH 5.1); separation voltage:  
300 V/cm; sample: butylamine 1 $\mu$ g/mL (injection: 10 $\mu$ L/min 5min)

### 2.2.3.3 富集时间对洗脱样品峰高的影响

系统考察了上样量对样品富集的影响。如图 2-6 所示，在相同样品浓度的情况下，富集后的样品峰高随富集时间的增加而增加，直至 SPE 柱吸附饱和而达到最高峰值。在实验中，针对 1 ng/mL 的丁胺和辛胺，最终选择的富集时间为 100 min。

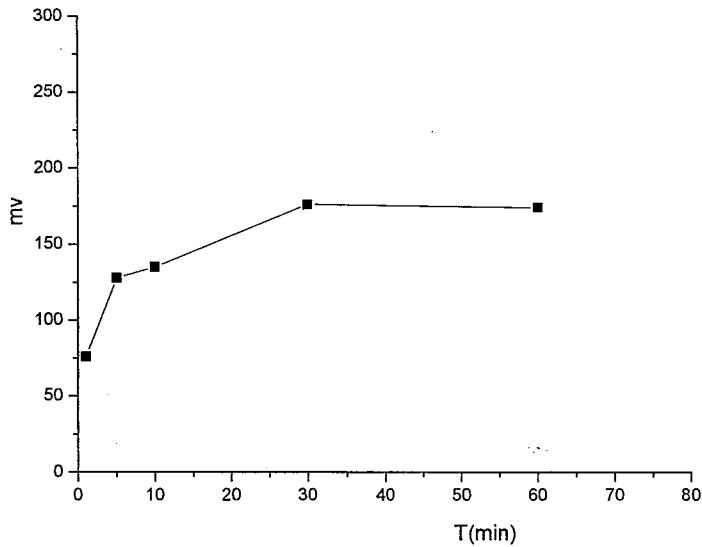


图 2-6 上样时间对丁胺洗脱峰高的影响

Figure 2-6 Effect of sampling time on peak height of butylamine

Experimental conditions: Experimental conditions were the same as those shown in Fig. 2-5; Sample: butylamine 1  $\mu\text{g/mL}$  (injection: 1  $\mu\text{L/min}$ )

#### 2.2.3.4 富集能力

系统考察了 SPE 柱的最大富集能力。图 2-7 中图 a 和 b 分别为为 2  $\mu\text{g/mL}$  和 1  $\text{ng/mL}$  丁胺的芯片电泳谱图；图 c 为 1  $\text{ng/mL}$  的丁胺在 1  $\mu\text{L/min}$  流速下富集 100 min 后获得的芯片电泳。从图中可以看出，1  $\text{ng/mL}$  丁胺直接进样后在芯片区带电泳中无法检测；经在线富集后，芯片电泳分离的峰高为 2 mv。与 2  $\mu\text{g/mL}$  丁胺直接进样获得的芯片区带电泳峰高相同。

在富集前后获得的峰高相同的情况下，SPE 的富集倍数  $N$  可表示为：

$$N = \frac{C_1}{C_0} \quad \text{公式 (2-1)}$$

式2-1中,  $C_0$ 、 $C_1$  分别为目标待物在原始样品在富集前后的检测限浓度。

根据公式2-1, 基于磁性材料的芯片在线富集-电泳系统对丁胺的倍数可以达到2000倍。

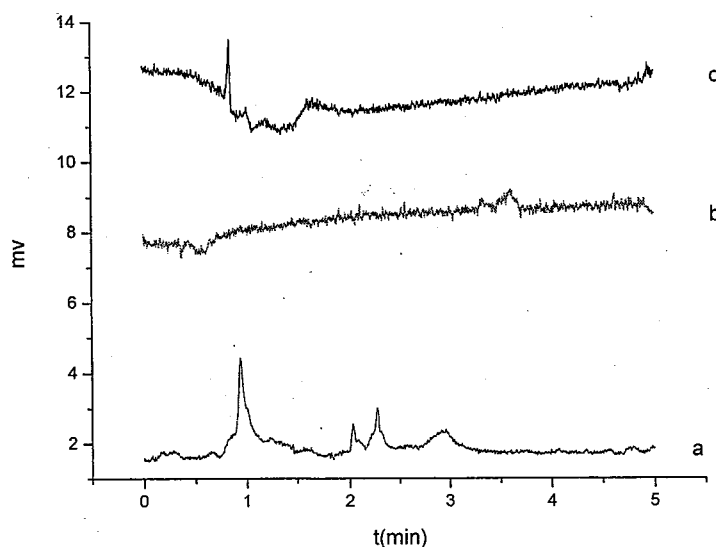


图 2-7. 未富集 (a b) 和富集后 (c) 丁胺的芯片区带电泳谱图

Figure 2-7 Electropherograms of butylamine analyzed by on microchip electrophoresis without (a b) and with (c) on-line enrichment

Experimental conditions: Experimental conditions were the same as those shown in Fig. 2-5; Sample: butylamine  $2\mu\text{g/mL}$ (injection: 300 V/cm 30s) for a,  $1\text{ ng/mL}$  (injection: 300 V/cm 30s) for b and  $1\text{ ng/mL}$  (injection:  $1\mu\text{L/min}$  100min) for c

### 2.2.3.5 脂肪胺的在线富集-区带电泳分离

利用丁字型芯片通道, 通过实时切换电压, 可以将 SPE 富集后洗脱的样品迁移到分离通道中, 实现芯片富集和分离的在线集成。在此过程中, 通过

控制迁移时间，可以避免将过量的乙腈进入分离通道，影响电泳分离。

在前面优化的条件下，丁胺和辛胺经基于磁性材料的芯片在线富集和电泳分析，获得基线分离和高灵敏度检测，如图 2-8 所示。

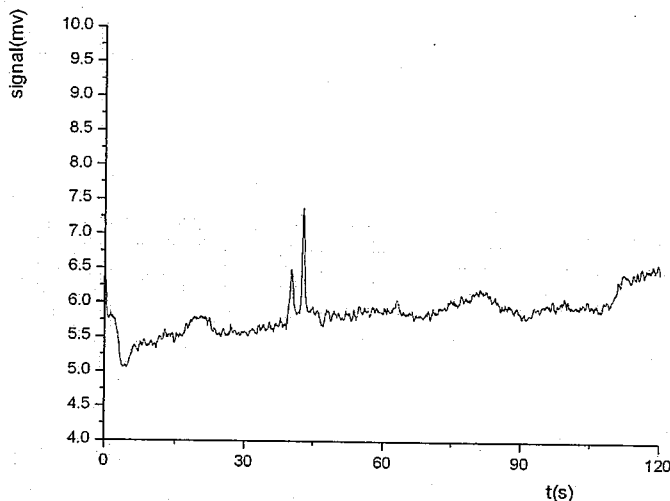


图 2-8 丁胺和辛胺的芯片富集-电泳分离谱图

Figure 2-8 Microchip based on-line enrichment and separation of butylamine and octylamine

Experimental conditions: Experimental conditions were the same as those shown in Fig. 2-5; Sample: butylamine 1ng/mL and Octylamine 1ng/mL (injection: 1 $\mu$ L/min 100min)

## 本章小结

1. 搭建了微流控芯片电泳系统平台，并发展了玻璃芯片的制作方法，获得了最佳蚀刻液配比和温度。以荧光素钠作为样品，见证该平台的检测限可达到  $2.7 \times 10^{-8}$  mol/L。

2. 将磁性介孔杂化材料填充到芯片通道中, 实现了固相萃取预富集和电泳分离的在线集成。在系统研究洗脱液引入方式、洗脱液量以及富集时间对样品富集效果影响的基础上, 可将丁胺的检测灵敏度提高 2000 倍。此外, 还实现了丁胺和辛胺的高通量分离和高灵敏度检测。

### 参考文献

1. 林炳承, 秦建华, 微流控芯片实验室 2006, 北京: 科学出版社
2. Cui H, Dutta P, Ivory CF. Isotachopheresis of proteins in a networked microfluidic chip: experiment and 2-D simulation. *Electrophoresis*. 2007 Apr;28(7):1138-45
3. Sommer G.J., Hatch A.V., IEF in microfluidic devices, *Electrophoresis*: 2009 Mar;30(5):742-57
4. Beard NP, Zhang CX, deMello AJ. In-column field-amplified sample stacking of biogenic amines on microfabricated electrophoresis devices. *Electrophoresis*. 2003 Feb; 24(4):732-9
5. Long Z, Liu D, Ye N, Qin J, Lin B. Integration of nanoporous membranes for sample filtration/preconcentration in microchip electrophoresis. *Electrophoresis*. 2006 Dec;27(24):4927-34
6. Liu C.J., Lien K.Y., Weng C.Y., Shin J.W., Chang T.Y., Lee G.B., Magnetic-bead-based microfluidic system for ribonucleic acid extraction and reverse transcription processes, *Biomed Microdevices*. 2009 Apr;11(2):339-50
7. Liu J., Chen C.F., Tsao C.W., Chang C.C., Chu C.C., DeVoe D.L., Polymer microchips integrating solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography using reversed-phase polymethacrylate monoliths, *Anal Chem*. 2009 Apr 1;81(7):2545-54
8. Broyles BS, Jacobson SC, Ramsey JM. Sample filtration, concentration, and

- separation integrated on microfluidic devices. *Anal Chem.* 2003 Jun 1; 75(11): 2761-7
9. Jemere A.B., Oleschuk R.D., Ochen F., Fajuyigbe F., Harrison D.J., An integrated solid-phase extraction system for sub-picomolar detection *Electrophoresis*, 2002, 23: 3537
  10. Karwa M., Hahn D., Mitra S., A sol-gel immobilization of nano and micron size sorbents in poly(dimethylsiloxane) (PDMS) microchannels for microscale solid phase extraction (SPE) *Analytica Chimica Acta* 546 (2005) 22-29
  11. Ohno K, Tachikawa K, Manz A., *Microfluidics: applications for analytical purposes in chemistry and biochemistry.*, *Electrophoresis.* 2008 Nov;29(22):4443-53
  12. Godin J., Chen C.H., Cho S.H., Qiao W., Tsai F., Lo Y.H., *Microfluidics and photonics for Bio-System-on-a-Chip: a review of advancements in technology towards a microfluidic flow cytometry chip*, *J Biophotonics.* 2008 Oct. 1(5): 355-76
  13. Li H.F., Lin J.M., *Applications of microfluidic systems in environmental analysis*, *Anal Bioanal Chem.* 2009 Jan;393(2):555-67
  14. Dittrich, P. S., Tachikawa, K., Manz, A., *Micro total analysis systems. Latest advancements and trends*, *Anal. Chem.* 2006, 78, 3887 – 3907
  15. Jia Z. J., Fang Q., Fang Z. L., *Bonding of glass microfluidic chips at room temperatures* *Anal. Chem.* 2004, 76, 5597-5602
  16. Chiem N., Harrison D.J., *Microchip-based capillary electrophoresis for immunoassays: analysis of monoclonal antibodies and theophylline* *Anal. Chem.* 1997, 69: 373-378
  17. Jacobson S.C., Ramsey J.M., *Microchip device for performing enzyme assays* *Anal. Chem.* 1997, 69: 3212-3217
  18. Broyles B.S., Jacobson S.C., Ramsey J.M., *Sample filtration, concentration, and separation integrated on microfluidic devices* *Anal. Chem.* 2003,

75(11):2761

19. Ju DY, Bian P., Development of Ferrite Magnetic Materials with High Strength by a Low-Temperature Sintering Method, *Science of Engineering Ceramics 111 Key Engineering Materials* 2006, 317-318: 893
20. Furlani E.P., Sahoo Y., Analytical model for the magnetic field and force in a magnetophoretic microsystem, *J. Phys. D: Appl. Phys.* 2006, 39, 1724-32
21. Huang MC, Ye H, Kuan YK, Li MH, Ying JY. Integrated two-step gene synthesis in a microfluidic device. *Lab Chip.* 2009 Jan 21;9(2):276-85

### 第三章 芯片等电聚焦方法研究

等电聚焦 (isoelectric focusing, IEF) 是一种根据样品等电点的差异进行分离的电泳模式。不仅对样品具有高的分辨率, 而且还有预富集能力, 已被广泛应用于蛋白质、多肽、氨基酸等样品的分离分析[1]。微流控芯片具有耗时短、样品用量少、易于微型化和集成化等优点[2,3]。因此, 近年来微流控芯片等电聚焦技术得到了人们的关注[4,5]。

实际样品中痕量组分的分离分析对芯片等电聚焦的检测灵敏度提出了更高的要求。因此, 高灵敏检测系统的研制成为芯片等电聚焦研究的热点[6-9]。尽管采用激光诱导荧光(LIF)作为芯片等电聚焦的检测器, 可将蛋白质、多肽等样品的检测限降低到  $10^{-6}$ - $10^{-10}$  mol/L, 但是仍然难以达到实际样品, 特别是蛋白质组中大量低丰度蛋白质的分离分析需求。因此, 发展新型样品富集技术, 提高芯片等电聚焦的灵敏度, 对于实现复杂体系中痕量组分的高灵敏度检测是十分必要的。

此外, 尽管等电聚焦具有较高的分辨率, 但是目前芯片等电聚焦的研究主要集中在芯片材料及表面修饰[10-12]、聚焦区带的迁移[13-15]和无两性电解质的芯片等电聚焦[16-20]。已报道中的芯片等电聚焦的分离能力仍然难以达到毛细管等电聚焦的分离效果[10]。为提高芯片等电聚焦的分离能力, Fan等[21]系统研究了通道长度和聚焦电压对分离能力的影响。研究表明, 芯片等电聚焦的分离度与聚焦电场强度的平方根成正比。这说明提高聚焦电场场强有利于改善芯片等电聚焦的分辨率。然而, 过高电场强度产生的焦耳热会对分离效果会造成负面影响。

为进一步提高芯片等电聚焦的灵敏度和分离度, 本章分别发展了富集进样等电聚焦和梯度电场强度等电聚焦技术, 并将其应用于大肠杆菌提取蛋白质的分离分析。研究成果有望在复杂样品的高效分离和高灵敏度检测方面发

挥重要作用。

## 第一节 芯片等电聚焦场放大进样技术

### 3.1.1 引言

在对复杂体系中痕量组分进行分离分析时,检测限是一个很关键的指标。由于芯片电泳不仅进样体积小,而且在柱检测的光程短,难以实现很多痕量组分的检测。为提高痕量组分的检测灵敏度,样品堆积[22]、等速电泳[23]和固相萃取[24]等方法已被用于芯片电泳的在线富集,可将系统的检测限降低2-3个数量级。

芯片等电聚焦采取整管进样方式,即将待测物和两性电解质的混合溶液充满微通道。随后,在微通道两端施加电压,使两性电解质形成pH梯度。待测组分在电场作用下迁移到与其等电点相同的pH区域时停止迁移,被聚焦成不同区带。因此,采用芯片等电聚焦模式,在分离的同时,可以实现样品的富集。徐溢等[25]在PDMS芯片上采用自由流等电聚焦电泳( $\mu$ FF-IEF),可以多肽连续分离的同时实现400倍的富集。

尽管芯片等电聚焦具有预富集作用,但常规芯片等电聚焦的富集能力受进样量和芯片尺寸的限制。为实际样品中的痕量组分的预富集,DeVoe等[26]在聚碳酸酯芯片通道内,发展了一种动态进样的芯片等电聚焦方法。首先将两性电解质充满聚焦通道,然后将溶解了样品的阳极缓冲液和阴极缓冲液分别加入到阳极和阴极缓冲液槽中。施加电压后两性电解质在通道中形成pH梯度,样品在电场的作用下源源不断的进入通道,迁移到其等电点处停止迁移,达到富集的目的。富集完成后,将阳极缓冲液槽和阴极缓冲液槽中的溶液更换为阳极和阴极缓冲液,施加电压进行等电聚焦。利用该方法,七肽(formyl-Nle-Leu-Phe-Nle-Tyr-Lys)的检测灵敏度可提高100倍。但是,在动态进样过程中,有些蛋白质和多肽可能降解或被氧化。

电堆积富集[27]是毛细管电泳中的一种常用在线样品浓缩技术。通过样品溶液和载体电解质的离子强度不同,使得加电时分配在样品溶液和载体电解质上的电场强度不同,从而将溶解在低电导缓冲溶液中的样品富集在与高电导两性电解质的界面上。基于这一原理发展的微流控芯片电泳在线场放大技术,可将样品的富集倍数达到10-100倍。Li等[28]在微流控芯片上使用反转电极的全柱堆集技术富集痕量蛋白质酶解产物,可将肽段的检测限降低50倍。Beard等[29]在芯片上利用柱内场放大堆积的方法分析了色胺和腐胺;将灵敏度提高了75-80倍,最低检测限达到20pmol/L。

本节将场放大样品堆积技术与等电聚焦相结合,发展了芯片等电聚焦场放大进样技术,并将其应用于蛋白质的芯片等电聚焦分离分析;将牛血清蛋白的灵敏度提高了1-2个数量级。此外,还将该方法用于大肠杆菌提取蛋白质的富集分析。

### 3.1.2 实验部分

#### 3.1.2.1 仪器与试剂

微流控芯片激光诱导荧光检测器购自浙江大学微分析系统研究所;XCDY 微流控芯片智能高压电源购自山东师范大学化学系;JKG-2A 光刻机购自上海学泽光学机械光学有限公司;DZF-6021 型真空干燥箱和 DKZ-2 型恒温振荡箱购自上海精宏实验设备有限公司;Z512B 型台式钻床购自杭州西湖台钻有限公司;SRJX-3-9 型箱式电炉和 KSY-6D-16A 型程序温度控制器购自沈阳市电炉厂;EC2000 色谱数据处理工作站购自大连依利特科学仪器有限公司。

N, N, N', N'-四甲基乙烯二胺 (TEMED, 99%)、过硫酸铵 (APS, 98%) 和3-甲基丙烯酸丙酯基三甲氧基硅烷( $\gamma$ -MAPS, 98%)、苯甲基磺酰氟(PMSF)购自Acros Organics (Geel, Belgium); 牛血清蛋白 (BSA) 购自上海生化所

(上海); 二甲亚砜 (DMSO) 购自沈阳化学试剂厂 (沈阳); 氢氟酸 (40%) 购自大连化学试剂公司 (大连); 异硫氰酸荧光素 (FITC, 90%) 购自百灵威化学试剂公司 (北京); BLT5403 大肠杆菌购自 Merck 公司 (Darmstadt, 德国); 载体两性电解质 Pharmalyte (pH3.0~10.0) 购自 Sigma (St. Louis, Missouri); Sephacryl<sup>TM</sup> S-200 购自 Amersham pharmacia 生物技术公司 (Uppsala, Sweden)。所用水为 Milli-Q 纯净水, 其他试剂皆为分析纯。

### 3.1.2.2 芯片加工

采用标准光刻技术制作玻璃芯片, 具体加工过程同 2.1.2.2。芯片为一字形通道 (如图 3-1), 长度、宽度和深度分别为 45 mm、100  $\mu\text{m}$  和 40  $\mu\text{m}$ 。

### 3.1.2.3 芯片表面修饰

对芯片通道表面采用线性聚丙烯酰胺进行涂层。具体修饰过程如下: 用 1 mol/L 氢氧化钠冲洗 4 h 后, 依次 0.1 mol/L 盐酸、水和甲醇冲洗 30 min。然后将 50% (v/v) 的  $\gamma$ -MAPS 甲醇溶液注入芯片通道内, 并将液槽充满溶液后, 在室温下密封反应 12 h。将芯片通道用甲醇冲洗 1 h 后, 再在室温下用  $\text{N}_2$  干燥 4—5 h。称取 25 mg 丙烯酰胺溶于 0.5 mL 水中, 用  $\text{N}_2$  脱气 30 min 后超声 2 min, 再向其中迅速加入 8  $\mu\text{L}$  的 10% TEMED (v/v) 和 8  $\mu\text{L}$  的 10% APS (w/v) 水溶液。超声 10 s 后, 迅速注入芯片通道中, 并置于密封容器内在室温下反应 12 h。最后用大量去离子水将通道冲洗干净。

### 3.1.2.4 电渗流测定

采用电流法监测芯片微通道内的电渗流的变化[30]。具体操作过程如下: 如图3-1示, 测量电渗流前, 在液槽1通道中充满40mM磷酸氢二钠, 在液槽2中充满20mM磷酸氢二钠。在槽2和槽1之间施加500v电压, 槽2为正极, 槽1为负极。20mM磷酸氢二钠在电渗流的作用下迁移, 并逐渐替换通道中的40mM的磷酸氢二钠。记录仪记录电流的变化, 直至电流降到最低, 并保持

不变。

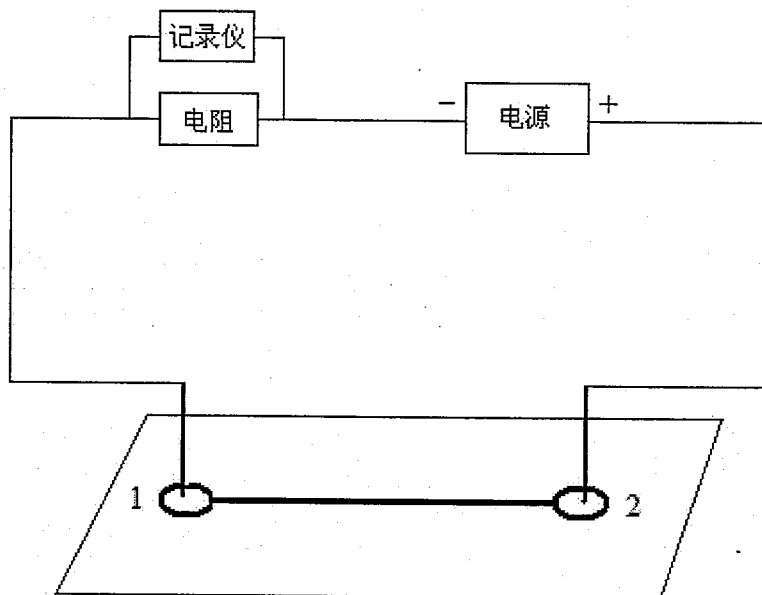


图 3-1 电渗流测量装置示意图

Figure 2-1 Schematic diagram of apparatus to measure electroosmotic flow

### 3.1.2.5 样品制备与标记

以 LB 作为培养基, 将大肠杆菌 Strain BLT 5403 在 37°C 条件下培养 14 h。将混合物在 4°C 下以 4300g 离心 10 min, 沉淀即为大肠杆菌。用 1×PBS 清洗三遍, 然后加入含 1 mmol/L PMSF 的 9 mol/L 尿素溶液 (大肠杆菌: 尿素溶液=1: 2, w:w), 冰浴超声 180 s。将得到的悬浮液以 20000 g 离心 20 min, 收集的上清液即为提取的蛋白质溶液, 储藏于 -80°C 下备用。采用 Bradford 法测定蛋白质浓度。

配制 10mg/ml FITC 溶液 (溶于 DMSO), 并按照 FITC: BSA=10: 1 的摩尔比向蛋白质溶液中加入 FITC。在室温下避光反应过夜后, 利用 Sephacryl

<sup>TM</sup> S-200 除去多余的荧光试剂。

### 3.1.2.5 富集进样等电聚焦

首先将 2%(v/v)两性电解质加入芯片液槽 1 中 (图 3-1)。加压充满通道后, 除去液槽中残留的溶液。将调节样品缓冲液至 pH 10.0 后加入阳极缓冲液槽 1; 将 20mM NaOH (pH 12.2)加入阴极缓冲液槽 2。然后, 在阴极缓冲液槽上施加正高压, 并将阳极缓冲液槽接地。样品在电场驱动下向阴极缓冲液槽移动。一定时间后停止施加电压。将液槽洗净后, 分别将阳极缓冲液槽 1 和阴极缓冲液槽 2 充满 20mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (pH 2.1)和 20mM NaOH (pH 12.2)。在阳极缓冲液槽施加正高压, 在阴极缓冲液槽接地, 进行等电聚焦。聚焦完成后, 将阴极缓冲液槽中的 NaOH 更换为 20mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>。在液槽 1 施加正高压, 液槽 2 接地, 利用化学迁移法将聚焦后的区带迁移至检测窗口进行检测。

## 3.1.3 结果与讨论

### 3.1.3.1 芯片涂层评价

进行等电聚焦时, 电渗流的存在不仅会影响样品中各组分的聚焦效果, 而且会导致在样品未完全聚焦前迁移出通道。因此, 必须通过对芯片通道表面的修饰来抑制电渗流。

利用电流法监测芯片微通道内的电渗流的方法时, 电渗淌度 ( $\mu_{eof}$ ) 可依据公式3-1计算:

$$\mu_{eof} = \frac{L}{t \times E} = \frac{L^2}{t \times V} \quad \text{公式 (3-1)}$$

式中,  $\mu_{eof}$  为电渗淌度 ( $\text{cm}^2/(\text{V} \cdot \text{S})$ ); L 为通道长度 (cm); t 为时间 (s), 即低浓度缓冲液替换通道内高浓度缓冲液所需的时间; E 为电场强度 (V/cm); V 为电压 (V)。

未修饰玻璃芯片的  $\mu_{eof}$  为:

$$\mu_{\text{eof}} = \frac{L}{t \times E} = \frac{4.5}{88.9 \times 140} = 3.6 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{Vs} \quad (\text{pH } 9.6)$$

修饰后玻璃芯片的  $\mu_{\text{eof}}$  为:

$$\mu_{\text{eof}} = \frac{L}{t \times E} = \frac{4.5}{88.9 \times 1500} = 3.4 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{Vs} \quad (\text{pH } 9.6)$$

可见, 修饰后的玻璃芯片通道产生的电渗淌度约为修饰前的 1/10。这说明采用聚丙烯酰胺涂层, 可以很好地抑制电渗流, 满足芯片等电聚焦的需要。

### 3.1.3.2 进样时间的影响

在进样过程中, 两性电解质带负电荷, 因此也会在电场作用下向施加正电压的阴极缓冲液槽迁移。为了考察两性电解质的迁移程度, 将两性电解质用 FITC 标记后进行富集进样过程, 并监测在进样过程中两性电解质的迁移情况。图 3-2 为进样过程中, 检测点在阴极缓冲液槽端的两性电解质迁移图。从图 3-2 可以看出, 2 min 内约 50% 两性电解质迁移出通道, 4 min 内两性电解质全部迁移出通道。因此在富集进样时, 进样时间必须小于 2 min 才能使剩余的两性电解质含量在 1% 以上, 从而保持聚焦能力。

### 3.1.3.3 富集效果

当样品缓冲溶液的离子强度小于分离缓冲溶液的离子强度时, 施加电压后, 分配在样品区带中的电场强度高于分离缓冲溶液区域。因此, 样品离子迁移速度显著提高。当样品离子迁移到样品溶液和载体电解质溶液的界面时, 在低电场作用下, 电泳迁移速度降低, 并在样品溶液和载体电解质溶液的界面处, 形成得到浓缩。因此, 只要样品缓冲溶液中离子强度相对于两性电解质足够小, 采用富集进样技术进入聚焦通道内的样品量比整管进样技术要大, 从而可以起到样品预富集的作用。

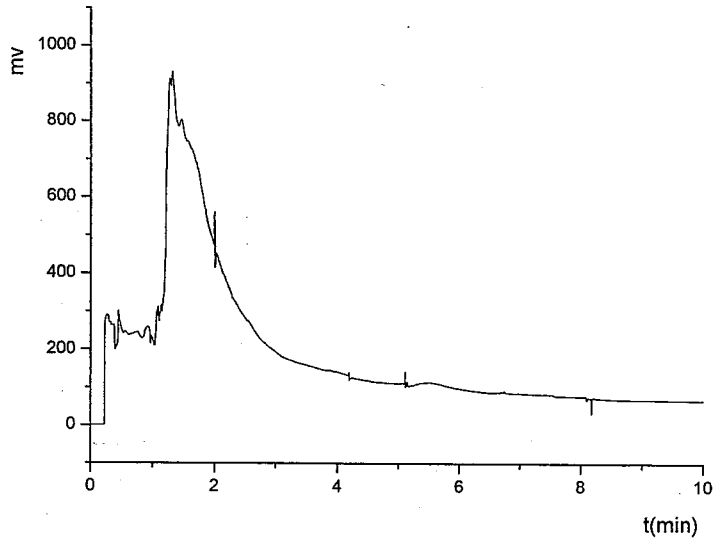


图 3-2 FITC 标记的两性电解质在芯片通道中的迁移

Figure 3-2 Migration of FITC-labeled ampholyte in microchannel

Experimental conditions: buffer: 20 mmol/L sodium phosphate (pH 8.0); electric field strength: 500 V/cm; sample: 20 mmol/L FITC labeled ampholyte.

图 3-3a 为常规等电聚焦获得的 1 mg/mL BSA 的电泳谱图；图 3-3b 采用芯片富集进样等电聚焦获得的 0.02 mg/mL BSA 的电泳谱图。从图中可以看出，1 mg/mL 和 0.02mg/mL BSA 在两种模式下获得的峰高分别为 95 和 72；富集进样等电聚焦将灵敏度提高了 38 倍。因此，采用富集进样等电聚焦技术，可以有效提高芯片等电聚焦的灵敏度。

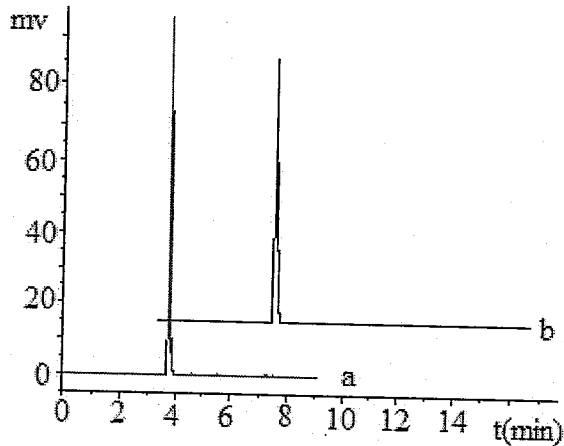


图 3-3. 牛血清白蛋白的芯片等电聚焦 (a) 和富集进样等电聚焦 (b)

Figure 3-3 Separation of BSA by conventional microchip IEF without (a) and with sample stacking (b)

Experimental conditions: cathode solution: 20 mmol/L NaOH; anode solution: 20 mmol/L  $H_3PO_4$ ; CIEF buffer: 2% v/v Pharmalyte (3-10); electric field strength: 500V/cm; sample: 1 mg/mL BSA in 20 mmol/L sodium phosphate for (a) and 0.02 mg/mL BSA in 4 mmol/L sodium phosphate for (b)

#### 3.1.3.4 大肠杆菌提取蛋白的芯片富集进样等电聚焦

为进一步考察芯片富集进样等电聚焦对实际样品的富集能力, 对大肠杆菌提取蛋白质进行了分离分析。从图 3-4 中可以看出, 与常规芯片等电聚焦方法相比, 采用富集进样方法能够有效降低被分析物的检测限, 非常适合复杂样品中痕量组分的分离检测。因此, 有望作为芯片二维电泳中的第一维分离模式。

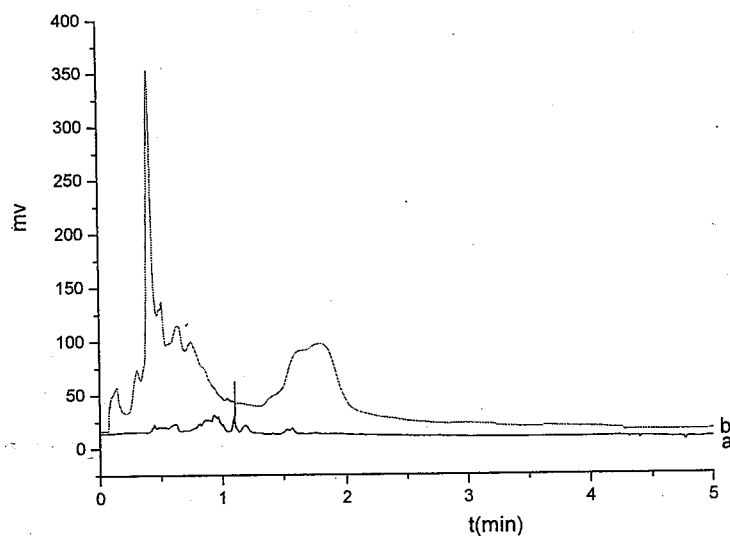


图 3-4. 大肠杆菌提取蛋白质的芯片等电聚焦 (a) 和富集进样等电聚焦 (b) 分离

Figure 3-4 Separation of proteins extracted from *E. Coli*. by conventional microchip IEF without (a) and with sample stacking (b)

Experimental conditions: Experimental conditions were the same as those shown in Fig. 3-3; sample: proteins extracted from *E. Coli* 1mg/mL in 20 mmol/L sodium phosphate (pH 9.6) for (a) and 0.4 mg/mL in 20 mmol/L sodium phosphate (pH 9.6) for (b)

## 第二节 芯片梯度场强等电聚焦

### 3.2.1 引言

与其他电泳技术相比,等电聚焦具有较高的分辨率和灵敏度。目前,文献报道的芯片等电聚焦的分辨率为 0.04-0.7 pH[5]。为进一步提高芯片等电聚焦的分离能力,Ivory 等[10]在 PDMS 芯片通道内,采取多步法等电聚焦分离了绿色荧光蛋白质。样品在宽 pH 梯度通道内聚焦后,其中一部分被转入窄 pH 梯度通道内,进一步聚焦分离。尽管采用该方法能够增加等电聚焦的分离度,但是操作步骤繁琐。

根据等电聚焦理论,等电聚焦的分离度与聚焦电场强度的平方根成正比[21]。在一定分离电压下,分离度与聚焦通道长度无关。这意味在芯片上可以采取超短通道,利用很高的聚焦电场强度获得较高的分离度和较短的分析时间[6]。然而过高电压下产生的焦耳热会对分离效果造成负面影响。目前芯片等电聚焦施加的电场强度一般低于 1000 V/cm[5]。因此,在能够有效避免焦耳热效应的前提下,通过增加聚焦电场强度开进一步提高等电聚焦分离能力的技术显得十分重要。

梯度电场强度法是指在开始时施加低电场强度,通过逐步提高电场强度达到优化分离的一种电场施加方法。Baba 等[31]率先将梯度电场强度法应用于 DNA 筛分,并显示出很高的分离能力。

本节基于芯片等电聚焦中载体两性电解质的导电性,发展了梯度电场强度等电聚焦技术,并将其应用于大肠杆菌提取蛋白质的分离分析。实验证明,梯度电场强度等电聚焦能够有效降低高电场强度时产生的焦耳热,进一步提高芯片等电聚焦的分离能力。

### 3.2.2 实验部分

#### 3.2.2.1 仪器和试剂

微流控芯片激光诱导荧光检测器购自浙江大学微分析系统研究所；XCDY 微流控芯片智能高压电源购自山东师范大学化学系；JKG-2A 光刻机购自上海学泽光学机械光学有限公司；DZF-6021 型真空干燥箱和 DKZ-2 型恒温振荡箱购自上海精宏实验设备有限公司；Z512B 型台式钻床购自杭州西湖台钻有限公司；SRJX-3-9 型箱式电炉和 KSY-6D-16A 型程序温度控制器购自沈阳市电炉厂；EC2000 色谱数据处理工作站购自大连依利特科学仪器有限公司。

N, N, N', N'-四甲基乙烯二胺 (TEMED, 99%)、过硫酸铵 (APS, 98%) 和 3-甲基丙烯酸丙酯基三甲氧基硅烷( $\gamma$ -MAPS, 98%)、苯甲基磺酰氟(PMSF) 购自 Acros Organics (Geel, Belgium)；牛血清蛋白 (BSA) 购自上海生化所 (上海)；二甲亚砜 (DMSO) 购自沈阳化学试剂厂 (沈阳)；氢氟酸 (40%) 购自大连化学试剂公司 (大连)；异硫氰酸荧光素 (FITC, 90%) 购自百灵威化学试剂公司 (北京)；BLT5403 大肠杆菌购自 Merck 公司 (Darmstadt, 德国)；载体两性电解质 Pharmalyte (pH3.0~10.0) 购自 Sigma (St.Louis, Missouri)；Sephacryl<sup>TM</sup> S-200 购自 Amersham pharmacia 生物技术公司(Uppsala, Sweden)。所用水为 Milli-Q 纯净水，其他试剂皆为分析纯。

#### 3.2.2.2 芯片加工与表面修饰

芯片加工和表面修饰同 2.1.2.2 和 3.1.2.3。

#### 3.2.2.3 梯度场强等电聚焦

利用压力将 2% (v/v) 的两性电解质和被分析样品的混合溶液注入芯片通道中。将液槽洗净后，分别向阳极和阴极贮液槽中加入 20 mmol/L 的  $H_3PO_4$  (pH

2.1)和20 mmol/L的NaOH (pH 12.2)溶液。在聚焦过程中,首先在液槽上施加低电压,到电流降低至焦耳热效应可以忽略时,再施加高电压进行聚焦。循环以上步骤直至聚焦完成。最后将阴极缓冲更换为20 mmol/L的H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>,利用化学迁移法加电将聚焦后的区带迁移至检测点。

### 3.2.3 结果与讨论

#### 3.2.3.1 分离电压对分离度的影响

等电聚焦的分离能力可以用公式 3-2 表述[32]:

$$\Delta pI = \sqrt{\frac{D[d(pH)/dx]}{E[d\mu/d(pH)]}} \quad \text{公式 (3-2)}$$

其中,  $\Delta pI$  是两种被分析物等电点差;  $D$  是溶液的扩散系数;  $d(pH)/dx$  是 pH 梯度;  $E$  是聚焦电场强度;  $d\mu/d(pH)$  是每一个等电点的淌度对 pH 的比值。

由此可以看出,等电聚焦的分离度与聚焦电场强度的平方根成正比。因此,提高聚焦电压能够有效改善等电聚焦的分离度。

#### 3.2.3.2 电场强度对聚焦时间的影响

在等电聚焦过程中,两性粒子的运动速度受电场强度和粒子荷质比影响。对某一特定粒子,在电场中运动速度与电场强度正相关。聚焦时间受两性粒子在电场中的运动速度影响,因此必然受电场强度影响。系统研究了电场强度对聚焦时间的影响。从图3-5给出的聚焦时间和聚焦电场强度的关系可以看出,等电聚焦的聚焦时间与聚焦场强的倒数成线性关系(线性方程为:  $y=9.61+11.65x$ ,  $R^2=0.9920$ )。这说明提高聚焦电场强度,能够缩短样品的分析时间。

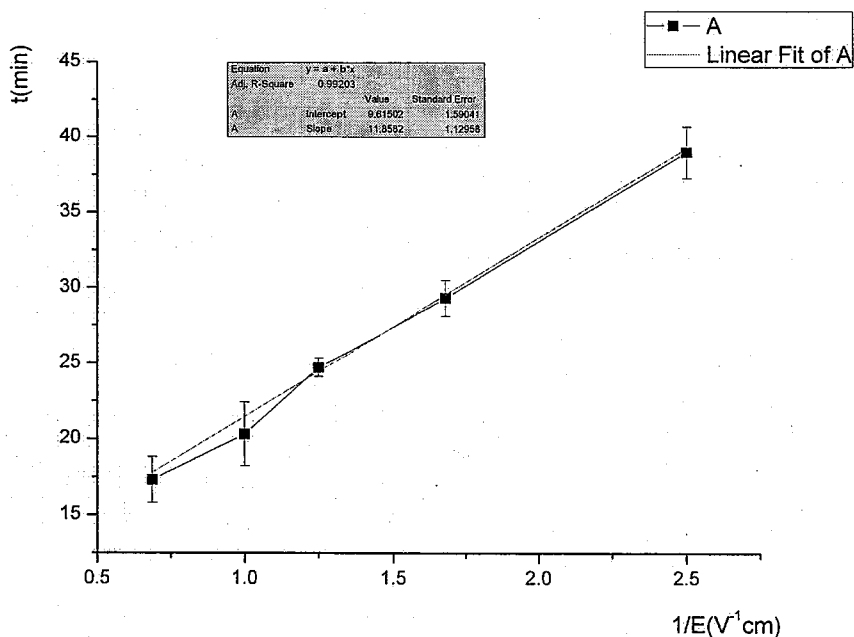


图3-5 芯片等电聚焦中聚焦时间和电场强度倒数关系

Figure 3-5. Relationship between the focusing time and the inverse of the electric field strength in microchip IEF

Experimental conditions: glass chip with channel of 4.5 cm long, 100 $\mu$ m wide and 40 $\mu$ m deep, coated by polyacrylamide; cathode solution: 20 mM NaOH; anode solution: 20 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>; buffer: 2% v/v Pharmalyte (3-10).

### 3.2.3.3 聚焦场强对两性电解质电导的影响

尽管提高聚焦电场强度可以改善芯片等电聚焦的分离度，并缩短分析时间，然而过高的聚焦电场强度下产生的焦耳热效应会对分离造成负面影响。由于焦耳热与两性电解质溶液的电导率密切相关，因此考察了聚焦电场强度对聚焦完成后两性电解质电导率的影响。从图 3-6 的结果可以看出，聚焦电场强度越大，聚焦完成后两性电解质的电导率越低。这可能是因为聚焦电场

强度越高, 聚焦完成后两性电解质越靠近其等电点, 因此所带电荷越小[33]。因此, 对芯片等电聚焦来说, 通过逐级增加电场强度的方法可以有效避免两性电解质的电导率过高。

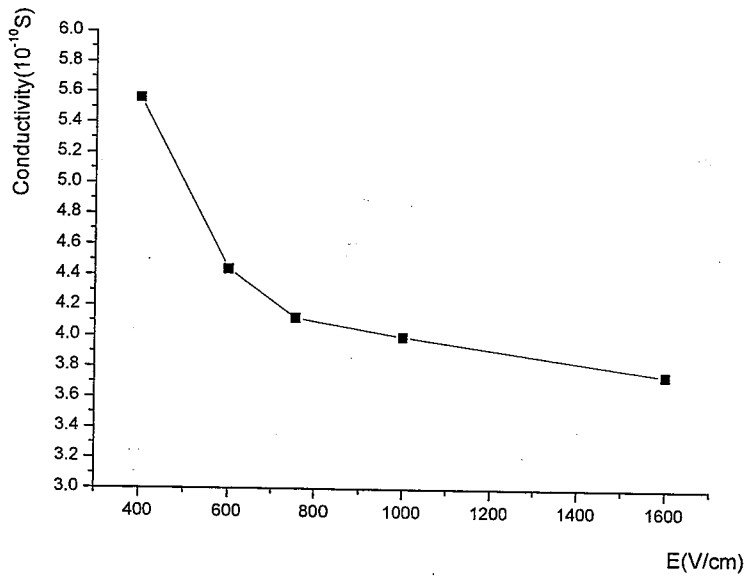


图3-6 聚焦完成后载体两性电解质的电导与电场强度关系图

Figure 3-6. Relationship between the conductivity of carrier ampholytes *versus* the applied electric field strength after focusing

Experimental conditions were the same as those shown in Fig. 3-5.

#### 3.2.3.4 梯度场强等电聚焦

在等电聚焦过程中, 电流直接影响焦耳热的大小。因此考察了聚焦过程中电流的变化趋势。如图 3-7 所示, 在 400 V/cm 聚焦场强下, 电流值开始很大 ( $12.9 \mu\text{A}$ ), 但随着聚焦的进行迅速降低。1.5 min 后下降速度趋于平缓, 最后在 40 min 达到最低值。

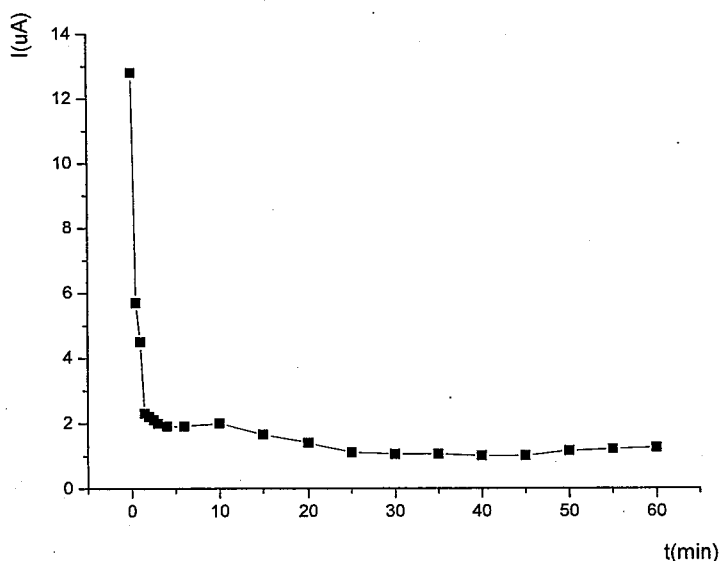


图 3-7 聚焦过程中的电流变化

Fig. 3-7 Current change of carrier ampholytes in chip IEF

Experimental conditions were the same as those shown in Fig. 3-5.

基于上述研究结果，研究了采用逐渐增大的梯度电场强度情况下电流的变化趋势。如图 3-8 所示，聚焦电场强度提高一次，电流呈现先增大后减小的变化趋势，但远远小于开始聚焦时电流初始值。这说明采用梯度场强的方法可以有效降低聚焦过程中的电流，从而避免提高聚焦场强时焦耳热效应对分离度的影响。

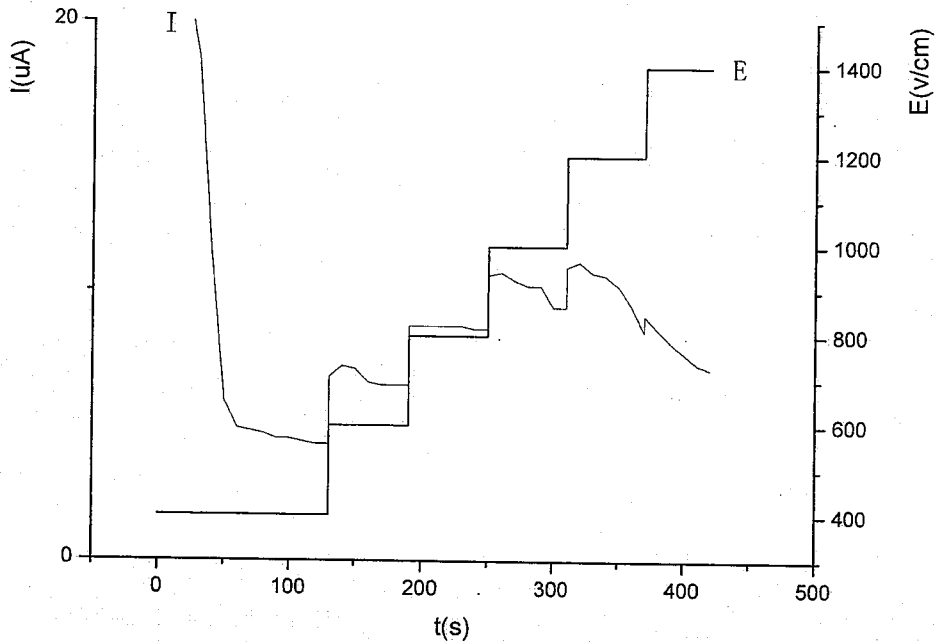


图3-8 梯度电场强度下载体两性电解质溶液的电流变化

Figure 3-8. Current change of carrier ampholytes with increased stepwise electric field strength.

The stepwise progression: 400 V/cm 2 min, 600 V/cm 1 min, 800 V/cm 1 min, 1000 V/cm 1 min, 1200 V/cm 1 min, 1400 V/cm 1 min. Other experimental conditions were the same as those shown in Fig. 3-5.

### 3.2.3.5 大肠杆菌提取蛋白的梯度场强等电聚焦

为考察梯度场强等电聚焦对实际样品的分离能力，对大肠杆菌提取蛋白质进行了分离分析。从图 3-9 中可以看出，与常规芯片等电聚焦相比，采用梯度场强等电聚焦能够在避免焦耳热影响的前提下，通过提高施加的电场强度，进一步提高芯片等电聚焦的分离能力。因此，有望在复杂样品的分离分

析中发挥重要的作用。

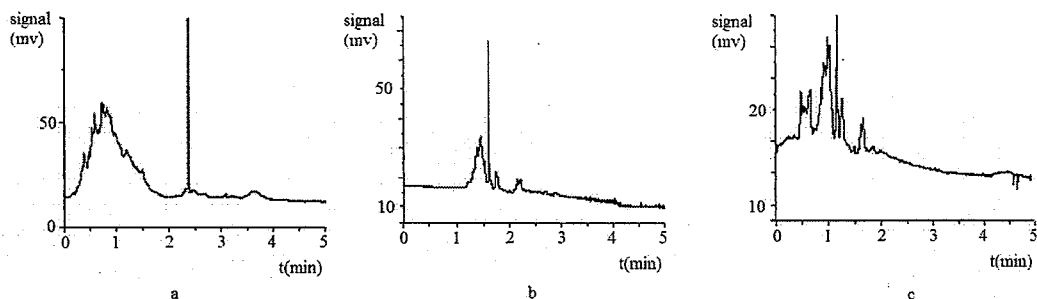


图3-8 芯片等电聚焦分离大肠杆菌提取蛋白时梯度场强的影响

Figure 3-8. Effect of stepwise gradient electric field on the separation of proteins extracted from *E. Coli* by microchip IEF

Experimental conditions: focusing electric field strength and time: 750 V/cm, 200 s for (a) 160 V/cm, 50 s; 550 V/cm, 20 s and 1000 V/cm, 50 s; for (b) 160 V/cm, 50 s, 550 V/cm, 20s and 1500 V/cm, 50s for (c). Other experimental conditions were the same as those shown in Fig. 3-5.

Sample: 1 mg/mL proteins extracted from *E. coli* in solution of 2% v/v Pharmalyte;

### 本章小结

1. 发展了一种能够有效提高芯片等电聚焦灵敏度的富集进样芯片等电聚焦方法，并在最佳条件下，对牛血清白蛋白和大肠杆菌提取蛋白进行了分离分析。同常规等电聚焦方法相比，采用富集进样方法能够将被分析物的检测灵敏度提高 1-2 个数量级。
2. 发展了一种芯片梯度电场强度等电聚焦法技术，并将该技术用于大肠杆菌

提取蛋白质的分离分析。同常规芯片等电聚焦相比,梯度场强等电聚焦技术能够在有效避免焦耳热影响的前提下,通过逐步提高施加的电场强度,进一步提高芯片等电聚焦的分离能力。

### 参考文献

1. Silvertand L.H., Toraño J.S., van Bennekom W.P, de Jong G.J., Recent developments in capillary isoelectric focusing, *J Chromatogr A*. 2008 Sep 19;1204(2):157-70
2. Dittrich, P. S., Tachikawa, K., Manz, A., Micro total analysis systems. Latest advancements and trends, *Anal. Chem.* 2006, 78, 3887 – 3907
3. Whitesides, G. M., The origins and the future of microfluidics, *Nature* 2006, 442, 368 – 373.
4. Shimura K., Recent advances in IEF in capillary tubes and microchips, *Electrophoresis*: 2009 Jan;30(1):11-28
5. Sommer G.J., Hatch A.V., IEF in microfluidic devices, *Electrophoresis*: 2009 Mar;30(5):742-57
6. Yao B., Yang H., Liang Q., Luo G., Wang L., Ren K., Gao Y., Wang Y. and Qiu Y., High-Speed, Whole-Column Fluorescence Imaging Detection for Isoelectric Focusing on a Microchip Using an Organic Light Emitting Diode as Light Source *Anal. Chem.* 2006, 78, 5845-5850
7. Wen J., Lin Y., Xiang F., Matson D. W., Udseth H. R., Smith R. D., Microfabricated isoelectric focusing device for direct electrospray ionization-mass spectrometry *Electrophoresis* 2000, 21, 191-196
8. Raisi F., Belgrader P., Borkholder D. A., Herr A. E., Kintz G. J., Pourhamadi F., Taylor M. T., Northrup M. A., Microchip isoelectric focusing using a miniature scanning detection system. *Electrophoresis* 2001, 22, 2291–2295

9. Huang X., Ren J., On-line chemiluminescence detection for isoelectric focusing of heme proteins on microchips. *Electrophoresis* 2005, 26, 3595–3601
10. Cui H., Horiuchi K., Dutta P., Ivory C. F., Multistage isoelectric focusing in a polymeric microfluidic chip *Anal. Chem.* 2005, 77, 1303–1309
11. Tan W., Fan Z. H., Qiu C. X., Ricco A. J., Gibbons, I., Miniaturized capillary isoelectric focusing in plastic microfluidic devices *Electrophoresis* 2002, 23, 3638–3645
12. Li C., Yang Y., Craighead H. G., Lee K. H., Isoelectric focusing in cyclic olefin copolymer microfluidic channels coated by polyacrylamide using a UV photografting method *Electrophoresis* 2005, 26, 1800–1806
13. Hofmann O., Che D., Cruickshank K. A., Müller U. R., Adaptation of capillary isoelectric focusing to microchannels on a glass chip. *Anal. Chem.* 1999, 71, 678–686
14. Li Y., DeVoe D. L., Lee C. S., Dynamic analyte introduction and focusing in plastic microfluidic devices for proteomic analysis. *Electrophoresis* 2003, 24, 193–199
15. Guillo C., Karlinsey J. M., Landers J. P., On-chip pumping for pressure mobilization of the focused zones following microchip isoelectric focusing. *Lab on Chip*, 2007, 7, 112–118
16. Huang T, Pawliszyn J. Microfabrication of a tapered channel for isoelectric focusing with thermally generated pH gradient. *Electrophoresis*. 2002 Oct;23(20):3504-10
17. Macounová, K., Cabrera, C. R., Holl, M. R., Yager, P., Generation of natural pH gradients in microfluidic channels for use in isoelectric focusing, *Anal. Chem.* 2000, 72, 3745–3751
18. Cabrera, C. R., Finlayson, B., Yager, P., Formation of natural pH gradients in a microfluidic device under flow conditions: model and experimental

- validation., *Anal. Chem.* 2001, 73, 658–666
19. Macounová, K., Cabrera, C. R., Yager, P., Concentration and separation of proteins in microfluidic channels on the basis of transverse IEF, *Anal. Chem.* 2001, 73, 1627–1633
  20. Sommer GJ, Singh AK, Hatch AV. On-chip isoelectric focusing using photopolymerized immobilized pH gradients. *Anal Chem.* 2008 May 1;80(9):3327-33
  21. Das C., Fan Z. H., Effects of separation length and voltage on isoelectric focusing in a plastic microfluidic device. *Electrophoresis* 2006, 27, 3619–3626
  22. Li J., Thibault P., Bings N. H., Skinner C. D., Wang C., Coyler C. Harrison J., Integration of microfabricated devices to capillary electrophoresis-electrospray mass spectrometry using a low dead volume connection: application to rapid analyses of proteolytic digests. *Anal. Chem.* 1999, 71, 3036–3045
  23. Huang H., Xu F., Dai Z., Lin B., On-line isotachophoretic preconcentration and gel electrophoretic separation of sodium dodecyl sulfate-proteins on a microchip. *Electrophoresis*, 2005, 26 : 2254~2260
  24. Figeys D., Aebersold R., Nanoflow solvent gradient delivery from a microfabricated device for protein identifications by electrospray ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.* 1998, 70, 3721–3727
  25. Xu Y, Zhang CX, Janasek D, Manz A. Sub-second isoelectric focusing in free flow using a microfluidic device *Lab Chip.* 2003 Nov;3(4):224-7
  26. Li, Y., DeVoe, D. L., Lee, C. S., Dynamic analyte introduction and focusing in plastic microfluidic devices for proteomic analysis, *Electrophoresis* 2003, 24, 193-199
  27. Mikkers F.E.P., Everaerts F.M., Verheggen T.P.E.M., High-performance zone electrophoresis, *J. Chromatogr.*, 1979, 169, 11-20

28. Li J, Wang C, Kelly JF, Harrison DJ, Thibault P. Rapid and sensitive separation of trace level protein digests using microfabricated devices coupled to a quadrupole--time-of-flight mass spectrometer. *Electrophoresis*. 2000 Jan; 21(1):198-210
29. Beard NP, Zhang CX, deMello AJ. In-column field-amplified sample stacking of biogenic amines on microfabricated electrophoresis devices. *Electrophoresis*. 2003 Feb; 24(4):732-9
30. Lee C.S., Blanchard W.C., Wu C.T., Direct control of the electroosmosis in capillary zone electrophoresis by using an external electric field. *Anal. Chem.*, 1990(62): 1550-1552
31. Inoue H, Tsuhako M, Baba Y. Enhanced separation of DNA sequencing products by capillary electrophoresis using a stepwise gradient of electric field strength. *J Chromatogr A*. 1998 Apr 3;802(1):179-84
32. Herr, A. E., Molho, J. I., Santiago, J. G., Kenny, T. W. et al., Hilton Head, SC 2000, pp. 115-119
33. Stoyanov A. V., Das C., Fredrickson C. K., Fan Z. H., Conductivity properties of carrier ampholyte pH gradients in isoelectric focusing *Electrophoresis* 2005, 26, 473-479

## 第四章 二维芯片电泳分离分析系统

多维分离[1]是近年来发展起来的一种新型分离技术。它是将通过具有不同原理的分离模式结合起来,提高系统的分离能力。Giddings[2]等提出,多维分离系统的峰容量为每一维分离模式单独使用时峰容量的乘积。与一维分离模式相比,多维分离不仅可以极大地提高系统的分辨率和峰容量,而且能够便捷地调整分离选择性,从而提供更多的样品信息。同时,他将二维系统分为连续二维系统(continuous two-dimensional operation)及耦合柱系统(coupled column assemblies)[3]。前者用于揭示样品中尽可能多的复杂组分;后者能够灵活地提供样品中特定组分的信息。

在一维芯片电泳分离中,尽管样品的分析通量很高,但是由于受微通道分离长度、施加电压、焦耳热等各种因素的限制,获得的有效柱效和峰容量十分有限,难以满足复杂样品的分析要求。因此,发展芯片二维电泳分析是十分重要的。此外,在芯片上可以直接利用垂直交叉的微通道构建二维电泳系统,并通过调节作用在不同通道上的电压实现进样、分离、组分在多维间切换进样和再分离等基本操作。与常规二维色谱和二维毛细管电泳相比,不仅可以有效避免接口制作复杂、存在死体积等问题,而且能够提供更高的分析通量。

Ramsey 研究小组最早开展了芯片二维电泳分离,并取得了系列的成果。他们首先将在芯片上实现了蛋白质酶解产物的二维胶束电动色谱-区带电泳分离,证明了二维分离的分辨能力远远高于其中的任何一维[4,5]。近年来,芯片二维电泳技术发展非常迅速,先后出现了芯片电色谱-区带电泳[6]、无胶筛分-胶束电动色谱[7]、等速电泳-区带电泳[8]、等电聚焦-区带电泳/凝胶电泳[9-12]等多种二维芯片电泳模式。其中,选用等电聚焦作为第一维分离模式,不仅可以获得很高的分辨率,而且可以对样品中的痕量组分进行富集。是二

维芯片电泳理想的第一维分离模式。然而，目前在此方面开展的研究非常有限。

本章采用自由溶液等电聚焦作为第一维分离模式，区带电泳作为第二维分离模式，成功构建了芯片二维电泳分离分析平台，并将其应用于蛋白质和多肽的分离分析中。此外，为避免第一维流出两性电解质对第二维分离的干扰，在第一维分离通道内制备了固定化 pH 梯度整体材料。在无需添加两性电解质的情况下，探索了二维固载 pH 梯度等电聚焦-区带电泳的可行性。

## 第一节 二维芯片等电聚焦-区带电泳

### 4.1.1 引言

目前以等电聚焦作为第一维分离模式的芯片二维电泳主要是将传统的二维凝胶电泳转移到芯片上进行[9-11]。不仅存在胶上操作费时费力、样品回收率低等问题，而且难以实现和质谱的在线联用。最近，Herr发展了一种新型的芯片二维等电聚焦-区带电泳系统，并用于多肽的分离分析[12]。芯片采用简单的十字形通道，在2.8 cm长的横向通道内进行第一维溶液等电聚焦后，在横向通道施加6-10 s电压，利用电渗流将聚焦区带迁移至通道交叉处进行第二维的进样，然后切换电压，在2.5 cm长的纵向通道内进行第二维区带电泳分离。该方法不仅操作方便，而且系统峰容量可以达到1300。然而利用电渗流迁移第一维的聚焦区带，不仅会影响等电聚焦的分离度，而且很难控制将所有的样品全部转移到第二维进行进一步的分离。

在本节中，研制了二维自由溶液等电聚焦-区带电泳芯片。通过通道内壁的涂层，有效抑制了第一维分离通道内的电渗流，并利用化学迁移将第一维的聚焦区带依次全部转移到区带电泳通道中，进行第二维分离。在系统研究各参数对分离效果影响的基础上，将该技术成功用于蛋白质和多肽的分析中。

## 4.1.2 实验部分

### 4.1.2.1 仪器与试剂

微流控芯片激光诱导荧光检测器购自浙江大学微分析系统研究所；XCDY 微流控芯片智能高压电源购自山东师范大学化学系；JKG-2A 光刻机购自上海学泽光学机械有限公司；DZF-6021 型真空干燥箱和 DKZ-2 型恒温振荡箱购自上海精宏实验设备有限公司；Z512B 型台式钻床购自杭州西湖台钻有限公司；SRJX-3-9 型箱式电炉和 KSY-6D-16A 型程序温度控制器购自沈阳市电炉厂；EC2000 色谱数据处理工作站购自大连依利特科学仪器有限公司。

N, N, N', N'-四甲基乙烯二胺 (TEMED, 99%)、过硫酸铵 (APS, 98%) 3-甲基丙烯酸丙酯基三甲氧基硅烷 ( $\gamma$ -MAPS, 98%)、苯甲基磺酰氟 (Phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF) 购自 Acros Organics (Geel, Belgium); 牛血清蛋白购自上海生化所 (上海); 氢氟酸 (40%) 购自大连化学试剂公司 (大连); 异硫氰酸荧光素 (FITC, 90%) 购自百灵威化学试剂公司 (北京); 二甲亚砜 (DMSO) 购自沈阳化学试剂厂 (沈阳); BLT5403 大肠杆菌购自 Merck 公司 (Darmstadt, 德国); 胰蛋白酶、载体两性电解质 Pharmalyte (pH3.0~10.0) 购自 Sigma (St. Louis, Missouri); Sephacryl<sup>TM</sup> S-200 购自 Amersham pharmacia 生物技术公司 (Uppsala, Sweden)。所用水为 Milli-Q 纯净水, 其他试剂皆为分析纯。

### 4.1.2.2 芯片加工与修饰

设计的二维芯片结构如图 4-1 所示。其中在贮槽 1 和 2 之间进行自由溶液等电聚焦; 在十字交叉点与贮槽 4 之间进行区带电泳分离。芯片的具体加工过程同 2.1.2.2; 聚丙烯酰胺涂层的制备方法同 3.1.2.3。加工芯片微通道的宽度为 100  $\mu\text{m}$ , 深度为 40  $\mu\text{m}$ 。液槽 1 和 2 至交叉口处长度分别为 35 mm 和

2 mm; 液槽 3 和 4 至交叉口处长度分别为 5 mm 和 40 mm。

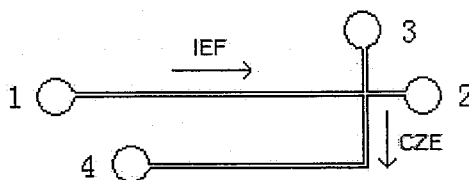


图4-1 二维电泳芯片结构图

Fig. 4-1 Layout of microchip for 2-D electrophoresis

#### 4.1.2.3 样品制备

大肠杆菌蛋白质的提取与蛋白质的荧光标记同 3.1.2.5。

蛋白质的酶解与多肽的标记：称取 10 mg 的蛋白质放入离心管中，依次加入 400  $\mu\text{L}$  50 mmol/L 碳酸氢钠溶液 (pH 8.0) 和 400  $\mu\text{L}$  乙腈。在 40 $^{\circ}\text{C}$  下放置 4 h 后，加入 1200  $\mu\text{L}$  50 mmol/L 的碳酸氢钠溶液(pH 8.0)，将蛋白质稀释到 5mg/ml。随后，向其中加入 20  $\mu\text{L}$  1 mg/mL 的胰蛋白酶溶液，使酶与底物的质量比为 1: 50。在 37 $^{\circ}\text{C}$  下反应 4 h 后，再加入 20  $\mu\text{L}$  1 mg/mL 的胰蛋白酶溶液，使最终酶与底物的质量比为 1: 25，并在 37 $^{\circ}\text{C}$  下反应 24 h。反应完成后向其中加入 10 mg/mL 溶解于 DMSO 的 FITC 溶液，使 FITC 与酶解前蛋白的摩尔比约为 10: 1。最后，在室温下避光反应过夜。

#### 4.1.2.4 一维芯片电泳分离

将含有 0.4% MC (m/v, 下同) 的 2% (v/v) 两性电解质和被分析物的混合物注入等电聚焦通道后，分别将阳极缓冲液槽和阴极缓冲液槽充满含有 0.2% MC 的 20 mmol/L  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (pH 2.1) 和含有 0.2% MC 的 20 mmol/L NaOH (pH

12.2)。在 1300 V/cm 电场强度下聚焦 120 s。聚焦完成后，将阴极缓冲液更换为含有 0.2% MC 的 20 mmol/L  $H_3PO_4$  (pH 2.1)。施加电压，在 360 v/cm 场强下将被分析物聚焦区带化学迁移至检测点。

#### 4.1.2.5 二维芯片电泳分离

首先将含有 0.2% MC 的 20mmol/L  $H_3PO_4$  加入液槽 2，加压使之充满全部通道。将所有液槽冲洗干净后，将含有 0.4% MC 的样品和 2%两性电解质的混合溶液加入液槽 1，加压使之充满液槽 1 和十字交叉口之间的通道。再次清洗所有液槽，并在液槽 1 中加入含有 0.2% MC 的 20mmol/L  $H_3PO_4$  作为阳极电解液，在液槽 2 中加入含有 0.2% MC 的 20mmol/L NaOH 作为阴极电解液。在液槽 3 和液槽 4 中加入含有 0.2% MC 的 20mmol/L 的  $H_3PO_4$  作为第二维的缓冲溶液。

芯片二维电泳的操作分为以下三个过程：第一维等电聚焦、第二维进样和第二维区带电泳。表 4-1 所示，首先在液槽 1 加电压，液槽 2 接地，液槽 3 和液槽 4 悬浮，在横向通道内进行等电聚焦。聚焦完成后，将液槽 1 中的阳极电解液 NaOH 更换为含有 0.2% MC 的 20mmol/L 的  $H_3PO_4$ ，并在液槽 1 加电压，液槽 4 接地，其余液槽悬浮。从而将聚焦后的区带化学迁移至第二维通道中。最后进行第二维的电泳分离。在液槽 3 加电压，液槽 4 接地，其余液槽悬浮。循环第二维进样和第二维区带电泳，直至所有组分得到分离。

表 4-1. 芯片二维电泳操作过程中的电压施加

Table 4-1 Applied voltages for 2-D microchip electrophoresis

	液槽 1	液槽 2	液槽 3	液槽 4
等电聚焦	高压	0 V	悬浮	悬浮
第二维进样	高压	悬浮	悬浮	0 V
区带电泳	悬浮	悬浮	高压	0 V

### 4.1.3 结果与讨论

#### 4.1.3.1 聚焦电场强度对分离效果的影响

以 BSA 酶解产物为样品,考察了施加电压对芯片自由溶液等电聚焦分离效果的影响。从图 4-2 可以看出,在 0-1.3 min 的检测时间内,随着聚焦电场强度从 750v/cm 提高到 1300v/cm,分离的肽段的峰的个数从 7 个增加到 9 个。说明在焦耳热可以忽略不计的情况下,提高聚焦电压,可有效改善样品的分辨率。和 3.2.3.1 讨论的结果一致。

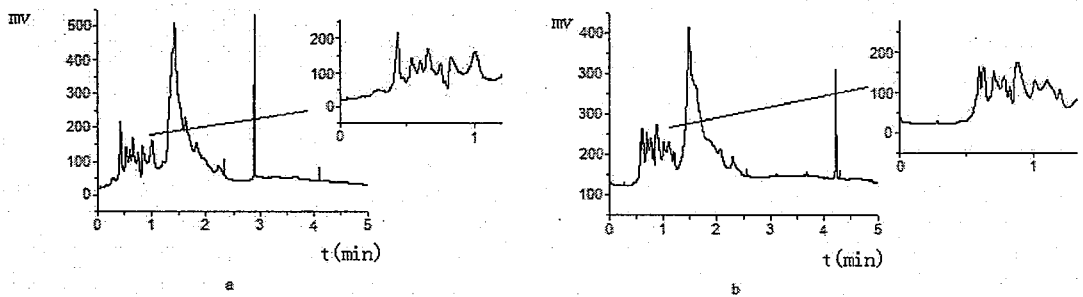


图4-2 BSA酶解产物的芯片等电聚焦分离谱图

Fig. 4-2 Electropherograms of BSA digest by microchip IEF

Experimental conditions: Cathode solution: 20 mmol/L NaOH containing 0.2% MC; anode solution: 20 mmol/L  $H_3PO_4$  containing 0.2% MC. channel length: 3.5 cm; focusing electric field strength: 750 V/cm for (a) and 1300 V/cm for (b). Sample: 1 mg/mL BSA digest in the solution of 0.4% (m/v) MC and 2% Pharmalyte (v/v)

第二维区带电泳的分离度可以用公式4-2表示:

$$R_s = \frac{1}{4\sqrt{2}} \Delta\mu_{ef} \left[ \frac{El}{D(\mu_{ef} + \mu_{eo})} \right]^{1/2} \quad \text{公式(4-2)}$$

其中,  $R_s$  是区带电泳的分离度;  $\Delta\mu_{ef}$  是两种被分析物的电迁移率差;  $\mu_{ef}$  是两种被分析物的的平均电迁移率;  $D$  是两种被分析物的平均扩散系数;  $E$  是电场强度;  $l$  是有效分离长度。

根据该公式可以看出, 在焦耳热可以忽略不计的情况下, 增加分离电场强度可以有效提高区带电泳的分离度。在本实验中, 最终确定的第二维芯片区带电泳的优化电场强度为 630 V/cm。

#### 4.1.3.2 分离通道长度对分离效果的影响

根据公式4-1, 等电聚焦的分离度与通道长度无关。因此, 在芯片等电聚焦中采取短通道, 不仅可以缩短聚焦时间, 而且有利于通过提高聚焦电场强度改善分辨率。在本实验中, 最终选择3.5cm长的第一维芯片等电聚焦分离通道。

根据公式4-2, 区带电泳的分离度与有效分离长度的平方根成正比。因此, 应选用较长通道来进行第二维的区带电泳。从图4-3可以看出, 在二维芯片电泳分离过程中, 将第二维分离通道的长度从2.5cm增加到4.5cm, 可将芯片区带电泳的峰容量从7增加到28。综合考虑到增加分离通道长度的同时也会增加样品的分析时间, 在本实验中, 最终选择的第二维分离通道长度为4.5cm。

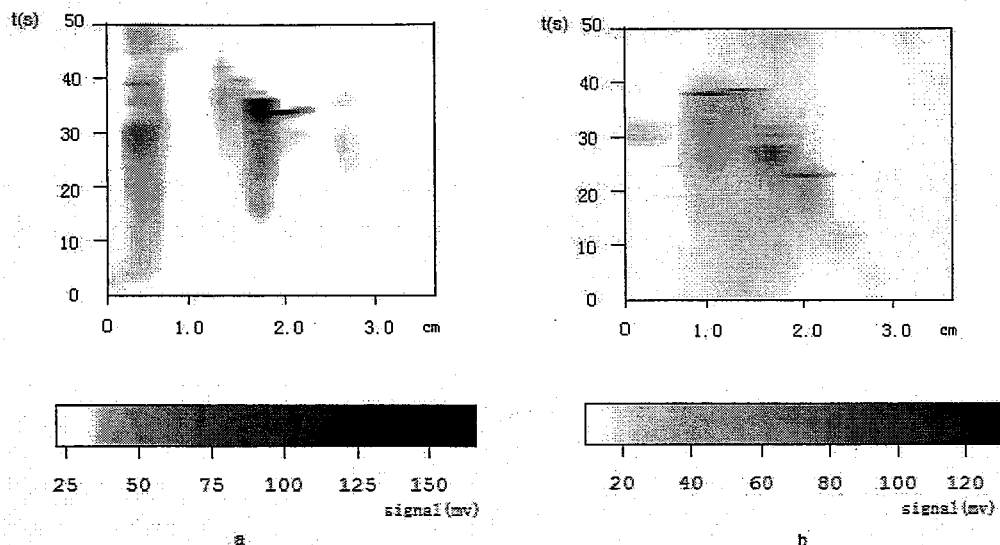


图4-3 区带电泳通道长度对二维芯片电泳分离度的影响

Fig. 4-3 Effect of CZE channel length on 2-D microchip electrophoresis separation

Experimental conditions: IEF: electric field strength: 1300 V/cm; CZE: sampling time: 10 s, sampling electric field strength: 360v/cm; separation electric field strength: 630 V/cm, separation buffer: 20 mmol/L  $H_3PO_4$  (pH 2.1) containing 0.2% MC, separation time: 50 s, channel length: 2.5cm (a) and 4.5cm (b). The data was processed by 3-D photo process software. Other conditions and the sample were the same as those in Fig. 4-2.

#### 4.1.3.3 第二维进样时间对分离效果的影响

在本实验中，通过在液槽1和液槽4上施加电压，可将聚焦后的被分析物从第一维通道迁移到第二维通道。在此过程中，必须保证所有的样品都能够进入到第二维，并且尽量减少因样品扩散引起的已分离组分的重新混合。为

此, 采用0.2% (m/v) MC作为区带电泳缓冲溶液的添加剂, 以增大缓冲溶液的粘度, 并减小扩散系数。

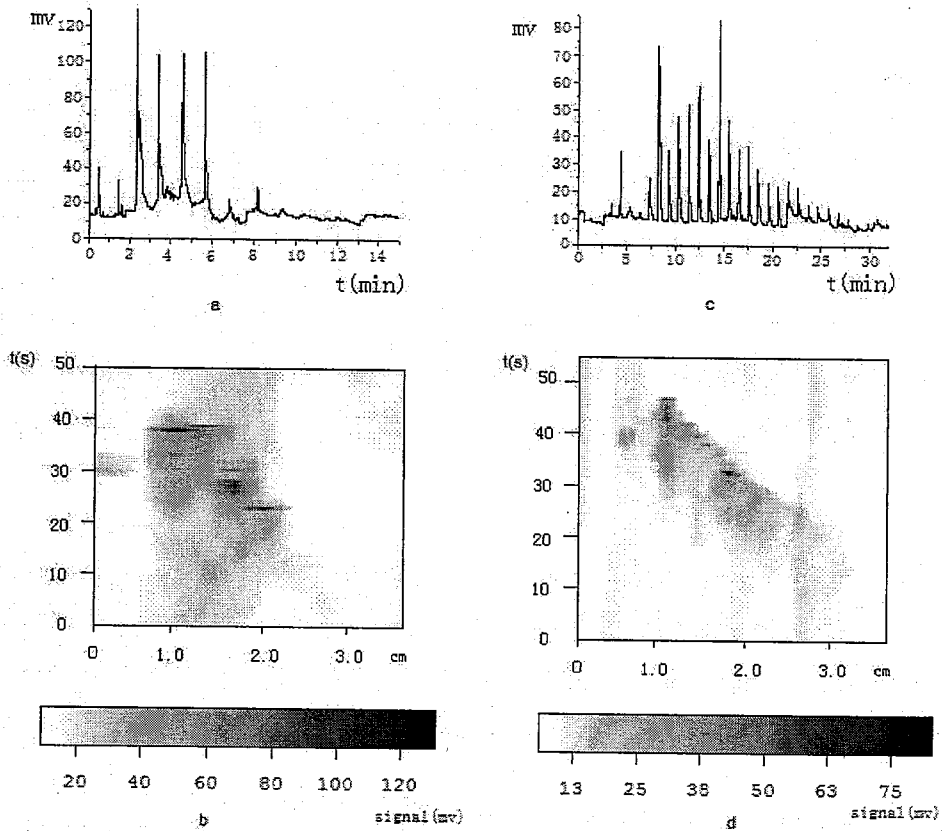


图 4-4 第二维进样时间对二维芯片电泳分离的影响

Fig. 4-4 Effect of the sampling time into the second dimension on 2-D microchip electrophoresis

Experimental conditions: CZE: channel length: 4.5cm, sampling and separation time: 10 s and 50 s (a), 6 s and 54 s (c). Images *b* and *d* were processed planer images corresponding to *a* and *c*. Other conditions and the sample were the same as those in Fig. 4-3.

考察了第二维进样时间对二维分离能力的影响。如图4-4所示,在其他条件相同时,第二维分别采用6s的进样时间和54s的分离时间,所得到的峰容量为540,高于第二维采用10s的进样时间和50s分离时间时的峰容量(238)。这可能是因为通过缩短第二维的进样时间,不仅可以减少样品区带的宽度,而且可以避免已分开组分的再次混合。

根据上述条件优化结果可以看出,在焦耳热可以忽略的情况下,提高芯片等电聚焦的电场强度和区带电泳分离通道的长度,并尽量减少第二维的进样时间,有利于提高二维芯片等电聚焦-区带电泳的分离能力。

#### 4.1.3.4 多肽的二维芯片等电聚焦-区带电泳分离

如图4-5所示,在优化的条件下,采用芯片二维芯片等电聚焦-区带电泳,不仅获得了较好的大肠杆菌提取蛋白质酶解产物的分析结果,而且分析时间(50 min)远远小于传统的二维凝胶电泳(>1天)和二维液相色谱(>10h)。研究结果表明,发展的芯片二维等电聚焦-区带电泳可以显著提高多肽混合物的分析通量。

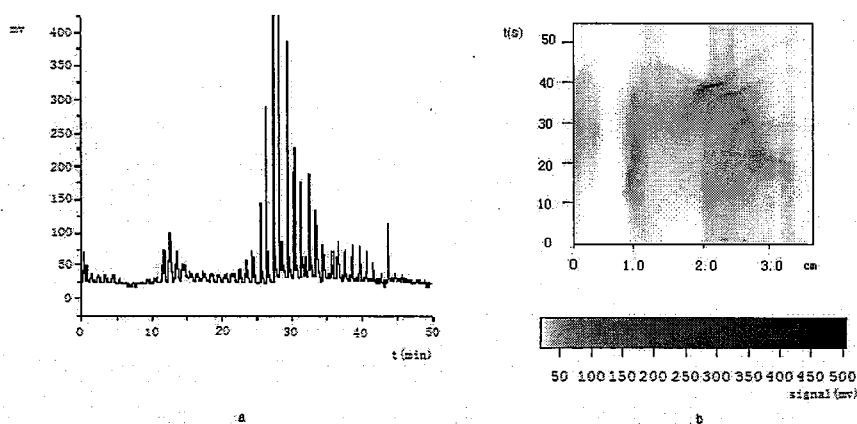


图 4-5 大肠杆菌提取蛋白酶解多肽的芯片二维等电聚焦-区带电泳

Fig. 4-5 Analysis of the digest of proteins extracted from *E. Coli* by 2-D

## microchip IEF-CZE

Experimental conditions: CZE: sampling and separation time: 4s and 56s. channel length: 4.5 cm Other conditions were the same as those in Fig. 4-3. Image *b* was the processed planer images corresponding to *a*

Sample: 1mg/mL extracted protein digest in solution of 0.4% (m/v) MC and 2% (v/v) Pharmalyte.

## 4.1.3.5 蛋白质的二维芯片等电聚焦-区带电泳分离

将发展的二维芯片等电聚焦-区带电泳技术应用于蛋白质的分离。从图 4-6 可以看出，三种蛋白及其异构体获得了较好的分离效果。在优化的条件下，该系统第一维峰容量为 15，第二维峰容量为 53，因此二维芯片电泳系统的峰容量可以达到 795。

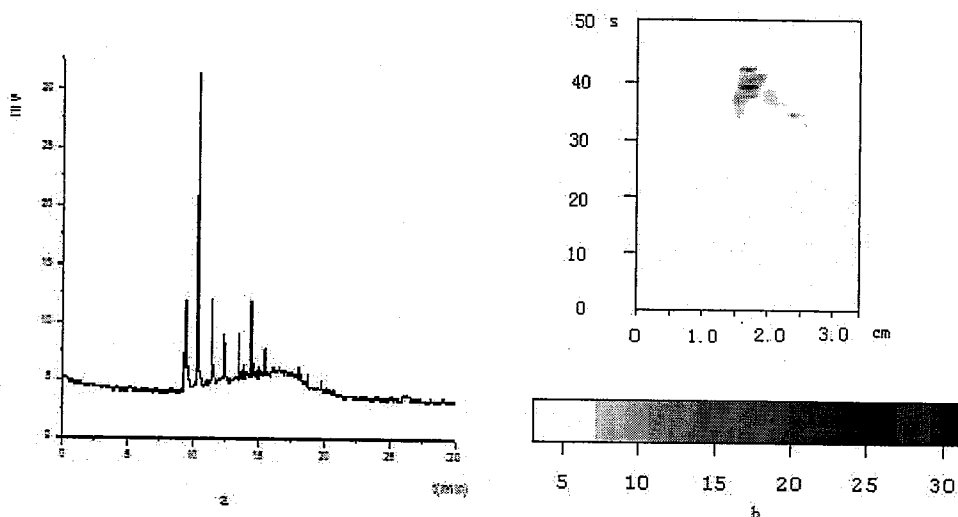


图4-6 三种标准蛋白的芯片二维等电聚焦-区带电泳分离图

Fig. 4-6 Separation of three proteins by 2-D microchip IEF-CZE

Experimental conditions were the same as those in Fig. 4-5. Image *b* was the processed planer images corresponding to *a*

Sample: myoglobin (from horse,  $pI$  7.3), Carbonic anhydrase (from bovine erythrocytes,  $pI$  5.9), and trypsin inhibitor (from lima bean,  $pI$  4.5); each concentration: 0.1mg/mL, in solution of 1.0 % (m/v) MC and 2% (v/v) Pharmalyte.

此外, 利用该系统分离了大肠杆菌提取蛋白质。从图 4-7 可以看出, 在 50 min 内可以获得较好的分离。这说明发展的芯片二维等电聚焦-区带电泳有望在实际样品的高通量分析中发挥重要作用。

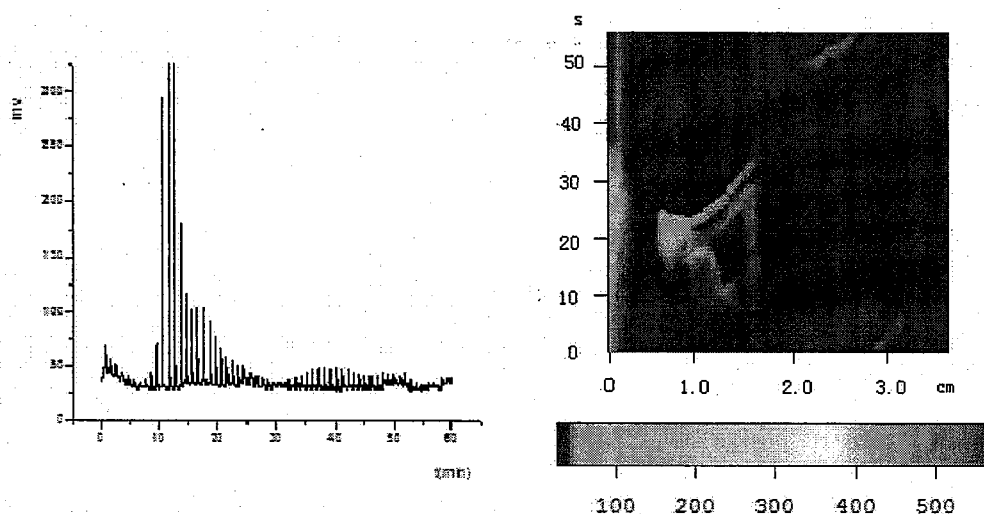


图4-7 大肠杆菌提取蛋白质的芯片二维等电聚焦-区带电泳分离

Fig. 4-7 Analysis of proteins extracted from *E. Coli* by 2-D microchip IEF-CZE. Experimental conditions were the same as those in Fig. 4-5. Image *b* was the processed planer images corresponding to *a*.

Sample: 2mg/mL extracted protein in solution of 1.0 % (m/v) MC and 2% (v/v) Pharmalyte.

## 第二节 二维固定化 pH 梯度等电聚焦-区带电泳芯片电泳探索

### 4.2.1 引言

芯片等电聚焦与其他电泳模式相比具有高分辨率和高灵敏度等优点,因此近年来受到越来越多的关注。然而,在等电聚焦分离过程中,通常需要在缓冲溶液中添加载体两性电解质,以形成稳定的pH梯度。然而,在聚焦过程中,载体两性电解质不仅会导致电流增大,焦耳热过高,而且可随样品进行迁移,影响样品的后续分离或鉴定。

尽管热致pH梯度[13]和电致pH梯度[14-16]等方法已被用来避免在溶液中添加两性电解质,但是利用这些方法产生的pH梯度不稳定,很难应用于实际样品的分离分析。固定化pH梯度等电聚焦技术是近年来发展起来的一种通过将两性载体Ampholine固载到毛细管整体材料上形成稳定pH梯度的技术。因此,使用固载pH梯度整体(M-IPG)材料可替代在溶液中添加自由移动的两性电解质。我们实验室较早开始这方面的研究,发展了基于聚丙烯酰胺基质的M-IPG整体柱,成功应用于M-IPG-CIEF分离[17-19],在制备M-IPG整体柱时,将两性电解质注入反应了整体材料的毛细管中,通过加电的方法使两性电解质在电场作用下迁移形成pH梯度后,通过热聚合或者光聚合反应将两性电解质与整体材料表面基团反应,得到M-IPG整体柱。不同于我们的制备策略,Sommer等[20]将混合了单体的高pH值两性电解质和低pH两性电解质分别置于芯片通道两端的液槽,通过扩散,在通道内形成pH梯度后,光聚合反应生成M-IPG整体柱。

在芯片二维电泳分离分析过程中,有效避免两维之间缓冲溶液的互相扩散干扰是至关重要的。Wang[21]等在构建的芯片IEF-ZE二维系统中,利用微阀将第一维缓冲溶液和第二维缓冲溶液隔离开来。然而微阀的制作过程相当繁琐。因此,在芯片上采用M-IPG材料进行等电聚焦可有效避免两维之间缓

冲液的干扰问题, 并利用整体材料产生的背压能够在一定程度上抑制聚焦区带的扩散, 更有利于第一维停留模式的二维分离。然而, 目前这方面的工作尚未见文献报道。

本节利用光引发聚合方法, 在二维芯片电泳的第一维分离通道内制备了M-IPG材料, 并在此基础上发展了二维M-IPG等电聚焦-区带电泳技术。通过设计新型连接接口, 利用压力驱动将第一维聚焦后的样品区带依次送入第二维区带电泳中进行进一步的分离。以BSA胰蛋白酶解多肽为样品, 探讨了芯片二维M-IPG等电聚焦-区带电泳的可行性。

## 4.2.2 实验部分

### 4.2.2.1 仪器与试剂

XX-15A/F 型紫外灯购自 Spectronics (New York, USA); XL-1500 紫外光联仪购自 Spectronics Corporation (Westbury, NY); 微流控芯片激光诱导荧光检测器购自浙江大学微分析系统研究所; XCDY 微流控芯片智能高压电源购自山东师范大学化学系; JKG-2A 光刻机购自上海学泽光学机械光学有限公司; DZF-6021 型真空干燥箱和 DKZ-2 型恒温振荡箱购自上海精宏实验设备有限公司; Z512B 型台式钻床购自杭州西湖台钻有限公司; SRJX-3-9 型箱式电炉和 KSY-6D-16A 型程序温度控制器购自沈阳市电炉厂; EC2000 色谱数据处理工作站购自大连依利特科学仪器有限公司。

N, N, N', N'-四甲基乙烯二胺 (TEMED, 99%)、过硫酸铵 (APS, 98%)、3-甲基丙烯酸丙酯基三甲氧基硅烷 ( $\gamma$ -MAPS, 98%) 购自 Acros Organics (Geel, Belgium)。二甲基亚砷 (DMSO) 购自沈阳化学试剂公司 (沈阳); 偶氮二异丁腈 (AIBN) 购自上海第四试剂公司 (上海); 丙烯酰胺 (AAm) 和 N, N'-亚甲基双丙烯酰胺 (Bis) 购自 Acros Organics (Morris Plains, New Jersey); 1,4-丁二醇, 十二醇和甲基丙烯酸缩水甘油酯 (GMA) 购自 Fluka (St. Gallen,

Switzerland); 牛血清蛋白购自上海生化所(上海); 氢氟酸(40%)购自大连化学试剂公司(大连); 异硫氰酸荧光素(FITC, 90%)购自百灵威化学试剂公司(北京); 二甲亚砜(DMSO)购自沈阳化学试剂厂(沈阳); 胰蛋白酶、载体两性电解质 ampholine(pH3.5~10.0)购自 Sigma (St.Louis, Missouri); Sephacryl<sup>TM</sup> S-200 购自 Amersham pharmacia 生物技术公司(Uppsala, Sweden)。所用水为 Milli-Q 纯净水, 其他试剂皆为分析纯。

#### 4.2.2.2 芯片加工与样品制备

设计的二维芯片结构如图 4-8 所示。其中在贮槽 1 和交叉口反应固定化 pH 梯度整体柱, 进行 M-IPG-IEF; 在十字交叉点与贮槽 4 之间进行区带电泳分离。芯片的具体加工过程同 2.1.2.2; 加工芯片微通道的宽度为 100  $\mu\text{m}$ , 深度为 40  $\mu\text{m}$ 。液槽 1 和 2 至交叉口处长度分别为 35 mm 和 2 mm; 液槽 3 和 4 至交叉口处长度分别为 5 mm 和 80 mm。

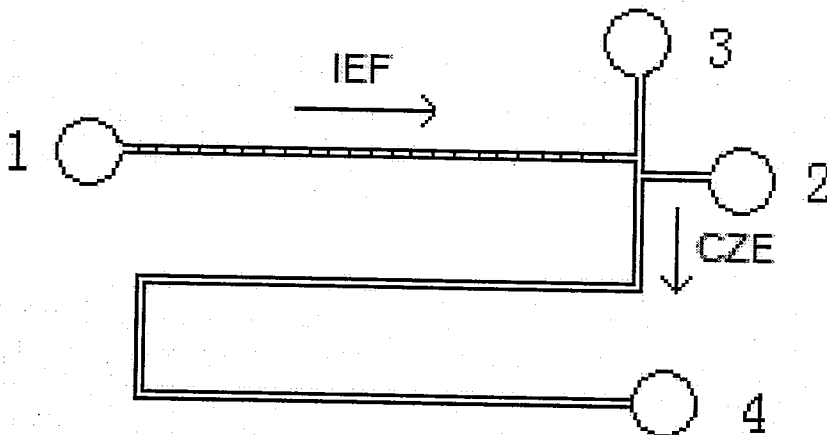


图4-8 二维M-IPG 等电聚焦-区带电泳芯片结构图

Fig. 4-8 Layout of 2-D M-IPG IEF-ZE microchip

The first dimension separation (IEF) was performed in the 3.5 cm-long-channel between reservoirs 1 (anolyte) and 2 (catholyte), and the second dimension separation (CZE) was performed in the 8.5 cm-long-channel between reservoirs 3 and 4.

蛋白质的酶解和荧光标记过程同 4.1.2.3。

#### 4.2.2.3 M-IPG 材料的制备

将芯片微通道用 1mol/L 氢氧化钠冲洗 4h 后, 依次用 0.1mol/L 盐酸、水和甲醇分别冲洗 30min。然后将 50% (v/v) 的  $\gamma$ -MAPS 甲醇溶液注入芯片通道内, 并充满液槽, 置于密封容器内, 在室温下反应 12h。随后用甲醇冲洗 1h, 并在室温下用氮气干燥 4-5h。

称取 26mg GMA、23mg 丙烯酰胺、56mg 双丙烯酰胺、460mg DMSO、230mg 1,4-丁二醇、230mg 十二醇和 1mg AIBN。混合均匀后, 用压力注入  $\gamma$ -MAPS 涂层后的芯片通道中, 并将液槽 1 至交叉口间的通道暴露在 365nm 紫外灯下照射 20min。然后分别用乙醇和水冲洗 1 h, 以除去通道内残余的反应试剂。向通道中注入 10% (v/v) ampholine。将液槽清洗干净后, 在液槽 1 和 2 中分别加入 20mmol/L  $H_3PO_4$  (pH 2.1)和 20mmol/L NaOH (pH 12.2)。在液槽 1 加电, 液槽 2 接地, 在 300 V/cm 电场强度下加电 5 min, 使两性电解质在通道内形成 pH 梯度。然后将芯片液槽密封, 置于 50°C 水浴中加热 24 h。反应完成后用水反复冲洗, 除去残留在通道内未反应的化合物。

#### 4.2.2.4 芯片固定化 pH 梯度等电聚焦

将被分析物的混合物注入等电聚焦芯片中, 分别将阳极缓冲液槽和阴极缓冲液槽充满 20 mmol/L  $H_3PO_4$  (pH 2.1) 和 20 mmol/L NaOH (pH 12.2)。在 300 V/cm 电场强度下聚焦 5 min。聚焦完成后, 利用压力将聚焦区带迁移

至检测点。

#### 4.2.2.5 二维 M-IPG 等电聚焦-区带电泳芯片电泳

首先将样品加入液槽 1，加压使之充满从液槽 1 到液槽 2 的通道，将各个液槽冲洗干净后，将液槽 1 和液槽 2 中分别加入 20mmol/L  $H_3PO_4$  和 20mmol/L NaOH 作为阳极缓冲液和阴极缓冲液，在液槽 3 和液槽 4 中加入 20mmol/L  $H_3PO_4$  作为第二维区带电泳缓冲溶液。在液槽 1 加高压，液槽 2 接地，进行等电聚焦。聚焦完成后，利用压力将聚焦区带迁移到通道交叉口处，完成第二维进样，然后在液槽 3 加电压，液槽 4 接地，进行第二维区带电泳。循环第二维进样和第二维区带电泳，直至所有组分得到分离。

### 4.2.3 结果与讨论

#### 4.2.3.1 固定化 pH 梯度材料制备条件优化

光引发技术具有反应速度快、位置可控等优点，已被广泛用于微流控芯片通道内聚合物反应的制备[22, 23]。在本实验中，选用 AIBN 作为光引发剂，在二维电泳芯片的第一维分离通道内制备了 M-IPG 材料。M-IPG 材料的制备过程如图 4-9 所示。

为避免样品在分离材料上的非特异性吸附，并提高基质材料对两性载体的固载能力，在实验中选择 GMA 和 AAm 为单体，N,N'-亚甲基双丙烯酰胺 (Bis) 为交联剂，DMSO、1,4-丁二醇和十二醇三元致孔剂作为致孔剂。增加 GMA 的含量可以增加整体柱上两性电解质的固载量，而丙烯酰胺可以增加整体柱的亲水性，降低整体柱对被分析物的吸附。增加交联剂 Bis 则可以增加整体柱的硬度。经优化，GMA, AAm 和 Bis 的最终质量配比确定为 26: 23: 56。

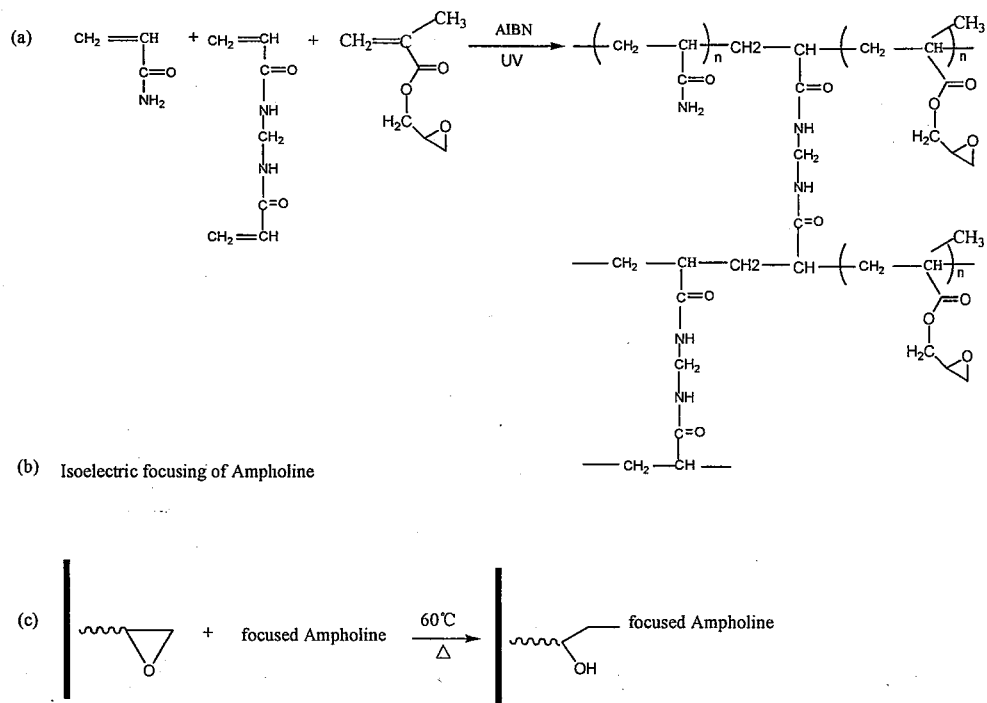


图 4-9 M-IPG 材料的制备

Fig. 4-9 Preparation procedure for M-IPG materials

致孔剂的选择对制备的整体材料的性能影响显著。其选择原则是既要能确保功能单体的溶解度，又要对功能单体间的相互作用干扰小。此外，还需要通过优化配比来调节材料的孔结构和机械强度。单体在 DMSO 中溶解性较好，而且 DMSO 的加入还可以增强整体柱的机械强度，因此 DMSO 被选作一种致孔剂。在该聚合反应体系中 1,4-丁二醇的加入有利于改善整体材料的均匀性，加入十二醇，则可以调整整体材料的机械强度。因此，最终选择了包含 DMSO、1,4-丁二醇和十二醇的三元致孔剂，并通过调节它们之间的配比来改善整体材料的性能。经优化，DMSO、十二醇和 1,4-丁二醇质量配比为 46: 23: 23。

两性载体的固化主要是靠两性载体中的功能基团氨基与整体材料中

GMA 所带的环氧基的化学反应来实现。选用聚丙烯酰胺作为固载基质,使得水溶性的两性载体分子在电场下按照等电点迁移。在形成稳定的 pH 梯度后于整体材料表面的环氧基反应实现固定化。该方法不仅制备过程简单,而且具有较高的成功率。

#### 4.2.3.2 固定化 pH 梯度芯片等电聚焦区带的迁移

芯片等电聚焦受限于芯片与常规分析的接口问题,通常用电渗流驱动或者化学迁移。然而在固定化 pH 梯度芯片等电聚焦后,化学迁移却引起了区带展宽。原因可能是在化学迁移过程中,固载在整体柱上的两性电解质带电荷而与被分析物发生作用。

为提供有效的压力驱动,设计了一种用于微流控芯片与常规分析系统连接的接口。如图 4-10 所示,接口由支架、接口和接头三部分。其中,支架为倒“U”字形框体。在其上方横梁的中部设置有横向凹槽,在其两侧的下端设置有向内的平板状凸台,其为托脚;接口为中空的管体,其上端设置有内螺纹,接头通过其上带有的外螺纹拧合于接口的上端,接口竖向嵌套于支架的横向凹槽内,置于横向的凹槽中的接口可沿横向凹槽来回移动。接口的下端设置有一内陷的用来卡住垫圈的凹槽,一垫圈置于凹槽内;所述接口的外表面设有外螺纹,在支架横槽的下方接口的外壁面上螺合有一缩紧螺母,接口外表面的外螺纹可用来调节缩紧螺母的位置。

利用连接接口连接芯片通道时,首先将接头拧合到接口上,然后将接口置于支架的横向凹槽中,拧上锁紧螺母;将芯片置于支架的托脚上,将垫圈置于接口下端的凹槽内,将其对准芯片液槽,拧合缩紧螺母,使接口与芯片液槽周边紧密接触,通过缩紧螺母在接口外表面的螺纹上下调动来紧固或者放松接口与芯片的接触;垫圈用来密封,阻止流体外流。

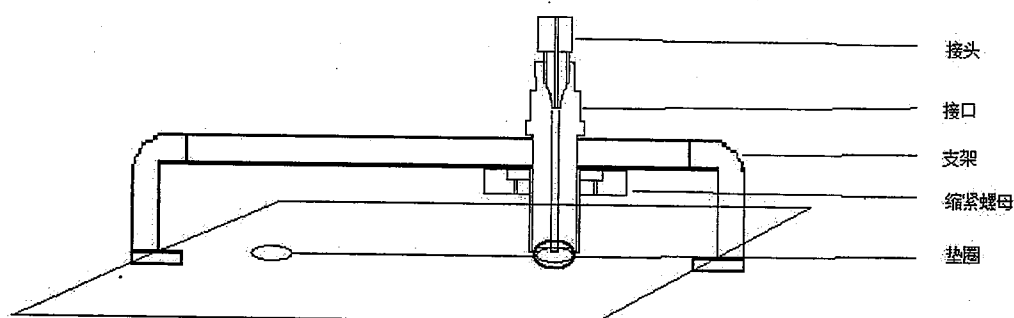


图 4-10 芯片和接口连接示意图

Fig. 4-10 Layout of the connection of microchip and conjunction

#### 4.2.3.3 多肽的芯片二维固定化 pH 梯度等电聚焦-区带电泳分离

固定化 pH 梯度整体柱中两性载体 Ampholine 固载到整体柱上, 进行 M-IPG-IEF 时, 不需要向缓冲溶液中加入载体两性电解质, 因此在进行二维电泳时不存在两维缓冲溶液相互干扰的问题, 有利于提高二维电泳的分离能力。

利用 BSA 胰蛋白酶解多肽作为样品, 考察了芯片二维固定化 pH 梯度等电聚焦-区带电泳的可行性。在第一维聚焦完成后, 将连接接口与芯片液槽连接, 采用手动泵进行驱动, 将聚焦后的区带分五次迁出, 并进一步采用区带电泳进行分离。结果如图 4-11 所示, 图中横轴坐标为 M-IPG 通道长度, 纵轴坐标为第二维出峰时间。从图中可以看出, BSA 胰蛋白酶解多肽在一定程度上得到分离。由于压力驱动过程中连接接口的死体积过大, 驱动时压力难以控制等因素, 因此第一维聚焦的区带基本上在第四次迁移时进入第二维分离。因此, 该系统的分离能力有待进一步改善。

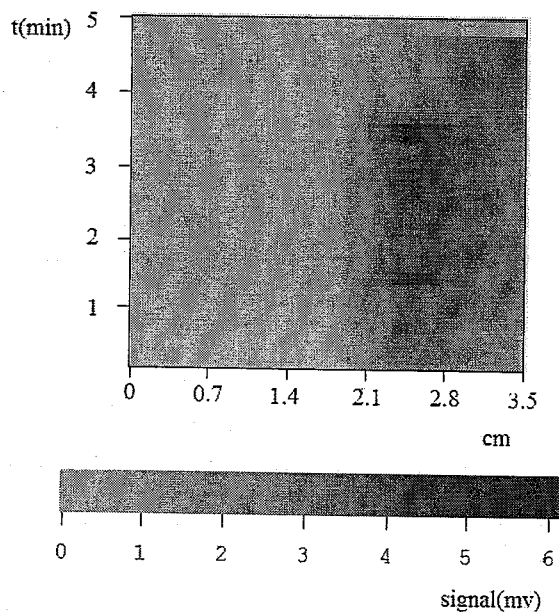


图 4-11 BSA 胰蛋白酶解多肽的二维芯片 M-IPG-IEF-CZE 分离

Fig. 4-11 Analysis of the digest of BSA by 2-D mIPG-IEF-CZE on microchip  
 Experimental conditions: IEF: cathode solution: 20 mmol/L NaOH; anode solution: 20 mmol/L  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ; electric field strength: 300 V/cm; CZE: buffer: 20 mmol/L  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (pH 2.1) electric field strength: 300 V/cm; Sample: 1mg/mL digest of BSA

## 本章小结

1. 在抑制电渗流的前提下，发展了二维芯片自由溶液等电聚焦-区带电泳技术，并在优化的条件下，在1 h内实现了大肠杆菌提取蛋白质和大肠杆菌提取蛋白质酶解产物的分离，系统峰容量可以达到795。研究表明，发展的芯片二维等电聚焦-区带电泳有望在实际样品的高通量分析中发挥重要作用。
2. 在芯片微通道内，利用原位光引发反应制备了固定化pH梯度整体材料，并构建了新型二维等电聚焦-区带电泳分离平台。采用该模式可有效避免在第一维分离缓冲溶液中添加两性电解质对后续分离的干扰，提高系统的分离能力。

## 参考文献

1. 张玉奎, 张维冰, 张丽华, 多维立体分离分析技术面临的挑战性问题及对应策略, 色谱, 2003, 21 (4), 299-302
2. Giddings J C. John Wiley and Sons, New York, 1991.112-141
3. Giddings, J. C., Concepts and comparisons in multidimensional separation. J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun. 1987, 10: 319-323.
4. Rocklin, R. D., Ramsey, R. S., Ramsey, J. M., A microfabricated fluidic device for performing two-dimensional liquid-phase separations Anal. Chem. 2000, 72, 5244-5249
5. Ramsey, J. D., Jacobson, S. C., Culbertson, C. T., Ramsey, J. M., High-efficiency, two-dimensional separations of protein digests on microfluidic devices. Anal. Chem. 2003, 75, 3758-3764
6. Gottschlich, N., Jacobson, S. C., Culbertson, C. T., Ramsey, J. M., Two-dimensional electrochromatography/capillary electrophoresis on a microchip. Anal. Chem. 2001, 73, 2669-2674
7. Shadpour, H., Soper, S. A., Two-dimensional electrophoretic separation of proteins using poly(methyl methacrylate) microchips. Anal. Chem. 2006, 78, 3519-3527
8. Huang, H. Q., Xu, F., Dai, Z. P., Lin, B.C., On-line isotachophoretic preconcentration and gel electrophoretic separation of sodium dodecyl sulfate-proteins on a microchip. Electrophoresis, 2005, 26, 2254-2260
9. Chen, X. X., Wu, H. K., Mao, C. D., Whitesides, G. M., A prototype two-dimensional capillary electrophoresis system fabricated in poly(dimethylsiloxane). Anal. Chem. 2002, 74, 1772-1778
10. Usui, K., Hiratsuka, A., Shiseki, K., Maruo, Y., Matsushima, T., Takahashi, K., Unuma, Y., Sakairi, K., Namatame, I., Ogawa, Y., Yokoyama, K., A

- self-contained polymeric 2-DE chip system for rapid and easy analysis. *Electrophoresis* 2006, 27, 3635–3642
11. Demianová, Z., Shimmo, M., Pösä, E., Franssila, S., Baumann, M., Toward an integrated microchip sized 2-D polyacrylamide slab gel electrophoresis device for proteomic analysis. *Electrophoresis* 2007, 28, 422–428
  12. Herr, A. E., Molho, J. I., Drouvalakis, K. A., Mikkelsen, J. C., Utz, P. J., Santiago J. G., Kenny, T. W., On-chip coupling of isoelectric focusing and free solution electrophoresis for multidimensional separations. *Anal. Chem.* 2003, 75, 1180–1187
  13. Huang T, Pawliszyn J. Microfabrication of a tapered channel for isoelectric focusing with thermally generated pH gradient. *Electrophoresis*. 2002 Oct;23(20):3504–10
  14. Macounová, K., Cabrera, C. R., Holl, M. R., Yager, P., Generation of natural pH gradients in microfluidic channels for use in isoelectric focusing, *Anal. Chem.* 2000, 72, 3745–3751
  15. Cabrera, C. R., Finlayson, B., Yager, P., Formation of natural pH gradients in a microfluidic device under flow conditions: model and experimental validation., *Anal. Chem.* 2001, 73, 658–666
  16. Macounová, K., Cabrera, C. R., Yager, P., Concentration and separation of proteins in microfluidic channels on the basis of transverse IEF, *Anal. Chem.* 2001, 73, 1627–1633
  17. Yang C., Zhu G., Zhang L., Zhang W., Zhang Y., Repeatedly usable immobilized pH gradient in a monolithic capillary column, *Electrophoresis*, 2004, 25, 1729–1734
  18. Zhu G., Yang C., Zhang L., Liang Z., Zhang W., Zhang Y., Preparation and application of monolithic columns with narrow immobilized pH gradients. *Talanta*, 2006, 70, 2–6
  19. Zhu G., Yuan H., Zhao P., Zhang L., Liang Z., Zhang W., Zhang Y.,

- Macroporous polyacrylamide-based monolithic column with immobilized pH gradient for protein analysis. *Electrophoresis* 2006, 27, 3578–3583
20. Sommer, G. J., Singh, A. K., Hatch, A.V., On-Chip Isoelectric Focusing Using Photopolymerized Immobilized pH Gradients *Anal. Chem.* 2008 , 80, 3327-3333
  21. Wang Y.C., Choi M.H., Han J., Two-Dimensional Protein Separation with Advanced Sample and Buffer Isolation Using Microfluidic Valves, *Anal. Chem.* 2004, 76, 4426-4431
  22. Yu C., Davey M.H., Svec F., Fréchet J.M., Monolithic porous polymer for on-chip solid-phase extraction and preconcentration prepared by photoinitiated in situ polymerization within a microfluidic device. *Anal. Chem.* 2001, 73, 5088-5096
  23. Hatch A.V., Herr A.E., Throckmorton D.J., Brennan J.S., Singh A.K., Integrated preconcentration SDS-PAGE of proteins in microchips using photopatterned cross-linked polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* 2006, 78, 4976-4984

## 第五章 新型微分离技术的发展与应用

随着生命科学、环境科学等领域研究的不断深入，人们对发展高效、快速、高灵敏度、低样品和溶剂消耗的新型微分离技术提出了越来越高的要求。目前，常用的微分离技术主要通过毛细管柱或微流控芯片来实现。

作为一种新型的微分离技术，毛细管电色谱（CEC）结合了微柱液相色谱的高分辨率和毛细管电泳的高效、快速等优点，已被成功应用于环境监测、药物分析、危险品检测等领域[1-4]。此外，由于CEC可以在接近生理环境下运行，因此非常适合生物大分子的分离分析，已被广泛用于DNA、RNA、蛋白质组、糖组、单细胞等分离，以及分子间相互作用研究等领域[5-7]。近年来，该领域的研究主要侧重于扩展其应用领域，而在方法学和新材料方面的进展相对缓慢。

芯片电泳技术是指在芯片的微细通道中，以电场为驱动力，根据带电样品在电场中迁移速率或者分配行为上的差异，实现复杂样品分离分析的技术[8]。近年来，随着微加工技术的日趋完善，芯片电泳技术得到了快速发展，并逐渐在微型化仪器的研制和实际样品的在线检测方面开始发挥作用。

本章通过研制了新型猪血清白蛋白（PSA）印迹材料，并采用CEC模式实现了模板蛋白质与非模板蛋白质的分离。此外，通过向缓冲溶液中添加动态改性剂，实现了脂肪胺类化合物在聚甲基丙烯酸甲酯（PMMA）芯片上的快速分离。

### 第一节 基于蛋白质印迹整体柱的毛细管电色谱技术

#### 5.1.1 引言

高效和高选择性的样品预处理技术对于实现复杂样品中痕量组分的分析

检测至关重要。分子印迹技术 (MIT) 是近年来发展起来的一种对特定目标化合物——印迹分子, 具有高选择性识别能力的技术[9]。通常被描述为制造识别“分子钥匙”的人工“锁”的技术[10-12]。利用该技术制备的聚合物——分子印迹聚合物 (MIPs), 内部具有固定大小和形状的孔穴, 并具有确定排列的功能基团。因此, 对印迹分子的立体结构具有“记忆”功能。与常用的一些吸附型分离介质相比, MIPs对目标化合物具有很高的选择性。因此, 已被广泛应用于色谱固定相[13]、酶催化[14]、固相萃取[15,16]以及膜分离[17]等领域。

目前, 分子印迹技术主要是以小分子为模板分子, 而生物大分子, 尤其是蛋白质, 的印迹技术发展相对缓慢[9, 18]。因此, 对蛋白质进行选择性的定量分析和生物传感等技术主要由抗体来实现。然而抗体不仅价格昂贵, 而且通常只能使用一次。因此, 制备具有高选择性和高特异性的蛋白质印迹材料是一个非常有意义的研究方向。

CEC作为一种新型微分离技术已被成功用于不同应用领域[19], 但目前尚未见基于蛋白质印迹材料的CEC分离。如将CEC与MIP结合, 不仅可以获得比HPLC更高的柱效[20], 而且还可实现目标化合物的高选择性分离。

本节以猪血清蛋白 (PSA) 作为模板, 甲基丙烯酰胺和甲基丙烯酸作为单体, 哌嗪双丙烯酰胺作为交联剂, 在毛细管内合成了 PSA 印迹整体柱, 并采用 CEC 模式实现了模板蛋白质与非模板蛋白质的分离。

## 5.1.2 实验部分

### 5.1.2.1 仪器与试剂

TriSep™ 2010GV 毛细管加压电色谱仪购自上海通微分析仪器有限公司; Echrom98 工作站和 Echrom98 V 2.0 版谱图处理软件购自大连依利特分析仪器有限公司; TJ-2A 型精密注射泵购自兰格恒流泵有限公司; 石英毛细管

(75  $\mu\text{m}$  I.D., 375  $\mu\text{m}$  O.D.) 购自河北永年光纤厂。

PSA、甲基丙烯酸酰胺、哌嗪双丙烯酸酰胺和胰蛋白酶抑制剂购自 Sigma 公司(St.Louis, Missouri); 甲基丙烯酸、N,N,N',N'-四甲基乙烯二胺 (TEMED, 99%)、过硫酸铵 (APS, 98%) 和 3-甲基丙烯酸丙酯基三甲氧基硅烷 ( $\gamma$ -MAPS, 98%) 购自 Acros Organics (Geel, Belgium); 十二烷基磺酸钠 (Sodium dodecyl sulfate, SDS) 购自 Promega Corporation (Madison, Wisconsin); 硫酸铵购自沈阳市联邦试剂厂 (沈阳); 冰乙酸购自天津科密欧化学试剂有限公司 (天津); 所用水为 Milli-Q 纯净水, 其他试剂皆为分析纯。

#### 5.1.2.2 毛细管预处理

将毛细管用 1 mol/L 氢氧化钠冲洗 4 h 后, 依次用 0.1 mol/L 盐酸、水和甲醇分别冲洗 30 min。用氮气将其吹干后, 将 50% (v/v) 的  $\gamma$ -MAPS 甲醇溶液注入毛细管内。两端密封后在室温下反应 12 h。最后用甲醇冲洗 1 h 后, 置于 70  $^{\circ}\text{C}$  的  $\text{N}_2$  流下干燥 1 h。

#### 5.1.2.3 空白柱制备

称取 43 mg 哌嗪双丙烯酸酰胺、27 mg 甲基丙烯酸酰胺、23.4 mg 硫酸铵、1 mg 甲基丙烯酸和 2 mg PSA, 并溶于 400  $\mu\text{L}$  的 10 mmol/L 磷酸钠盐 (pH 5.0) 缓冲液中。震荡预聚合一段时间后, 向其中加入 20  $\mu\text{L}$  APS (10% w/v) 和 15  $\mu\text{L}$  TEMED。混匀后立刻注入预处理的 75  $\mu\text{m}$  (i.d.) 毛细管, 并在室温下反应 24 h。

#### 5.1.2.4 PSA 印迹柱制备

称取 43 mg 哌嗪双丙烯酸酰胺、27 mg 甲基丙烯酸酰胺、23.4 mg 硫酸铵、1 mg 甲基丙烯酸和 2 mg PSA, 并溶于 400  $\mu\text{L}$  的 10 mmol/L 磷酸钠盐 (pH 5.0) 缓冲液中。震荡预聚合一段时间后, 向其中加入 20  $\mu\text{L}$  APS (10% w/v) 和 15  $\mu\text{L}$  TEMED。混匀后立刻注入预处理的 75  $\mu\text{m}$  (i.d.) 毛细管, 并在室温下反应

24 h。随后用 10% (w/v) SDS 和 10% (v/v) 醋酸依次冲洗印迹柱，以去除印迹模板。冲洗 24 h 后，用去离子水继续冲洗 24 h。

### 5.1.2.5 蛋白质分离

如图 5-1 示，毛细管总长 25 cm，整体柱长 10 cm；阴极端的 15 cm 空管用来提供电渗流。采用压力进样法将蛋白质引入整体材料柱端，然后将毛细管两端置入 50 mM 磷酸盐 (pH 4.0) 洗脱缓冲液中。施加 2.5 kV 电压，将蛋白质洗脱至检测点。

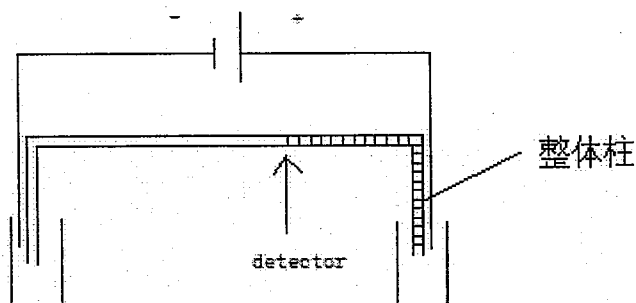


图 5-1. CEC 实验装置图

Figure 5-1 Schematic diagram of CEC apparatus

## 5.1.3 结果与讨论

### 5.1.3.1 缓冲液对模板蛋白质洗脱的影响

为选择合适的洗脱溶液，以压力为驱动力研究了不同洗脱溶液对蛋白质的洗脱效果。实验结果表明，在缓冲溶液中加入有机溶剂，如乙腈或者甲醇，无助于蛋白质的洗脱。然而如图 5-2 示，当利用 NaCl 溶液作为洗脱溶液时，样品的洗脱时间随 NaCl 浓度的减小而增长；当 NaCl 浓度小于 0.1 mol/L 时，

蛋白质无法洗脱。

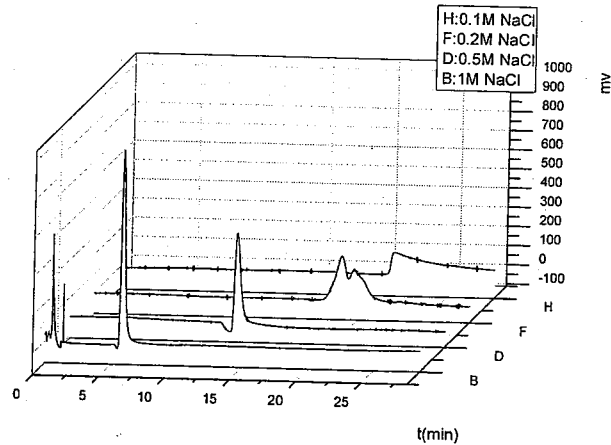


图 5-2 盐浓度对 PSA 洗脱的影响

Figure 5-2 Effect of buffer concentration on PSA elution

Experimental conditions: mobile phase: NaCl solution, mobile phase velocity: 500 nL/min; sample: 1 mg/mL PSA injection volume: 2  $\mu$ L

为满足 CEC 的分离需要，考察了以磷酸钠盐作为洗脱液时，模板蛋白质的洗脱情况。由图 5-3 可以看出，采用 50 mmol/L 磷酸钠盐 (pH 4.0) 既能将模板蛋白质完全洗脱，又具有合适的缓冲能力，可以满足 CEC 的分离需求。

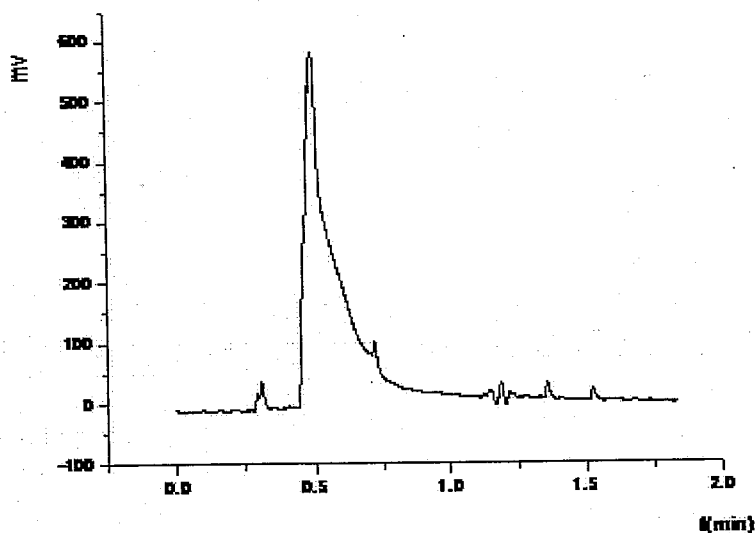


图 5-3 磷酸钠盐对 PSA 的洗脱谱图

Figure 5-3 Chromatogram of PSA eluted by sodium phosphate

Experimental conditions: mobile phase: 50 mmol/L sodium phosphate (pH 4.0), mobile phase velocity: 500 nL/min; sample: 1 mg/mL PSA, injection volume: 2  $\mu$ L

### 5.1.3.2 电压对模板蛋白质洗脱的影响

在电场作用下，模板蛋白质的洗脱时间主要受电渗流的影响。在焦耳热可以忽略不计的情况下，电渗流与电压成正比。因此，提高电压有助于缩短样品的分析时间。在 1-5 kV 的分离电压下，系统考察了电压对模板蛋白质洗脱的影响。结果表明，在 50 mmol/L 磷酸钠盐缓冲溶液 (pH 4.0) 中，当电压为 5 kV 时，洗脱过程中出现气泡。而当电压为 2.5 kV 时，产生的电渗流能够有效洗脱蛋白质 (如图 5-4)。因此，最终选择 2.5 kV 作为分离电压。

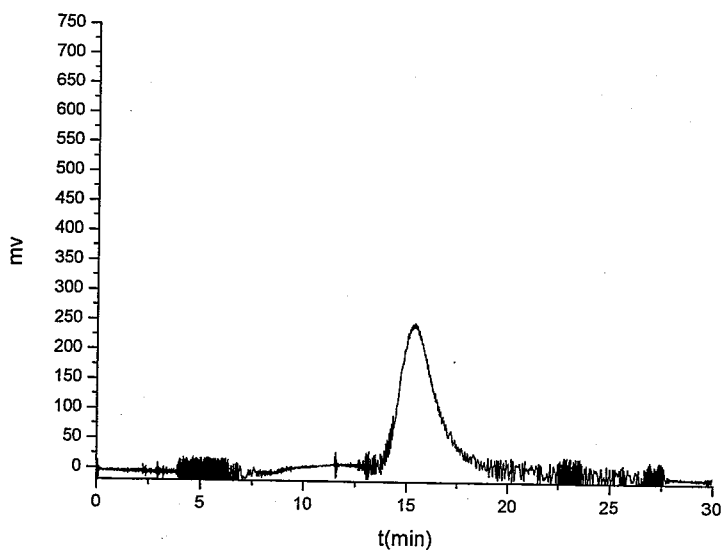


图 5-4 基于 MIP 整体柱的 PSA 的 CEC 谱图

Figure 5-4 Electrochromatogram of PSA by CEC with MIP monolithic column  
Experimental conditions: mobile phase: 50 mmol/L sodium phosphate (pH 4.0),  
separation voltage: 2.5 kV; sample: 1 mg/mL PSA, injection volume: 2  $\mu$ L

### 5.1.3.3 猪血清蛋白和胰蛋白酶抑制剂的分离

如图 5-5 所示, 基于上述优化的实验条件, 采用 PSA 印迹整体柱, 在 50 mM 磷酸盐 (pH 4.0) 缓冲体系中, 施加 2.5 kV 的电压, 在 CEC 模式下实现了猪血清蛋白和胰蛋白酶抑制剂的分离; 而采用非印迹柱, 却无法将两者分开。这说明制备的蛋白质分子印迹整体柱对模板蛋白质具有较好的识别效果。

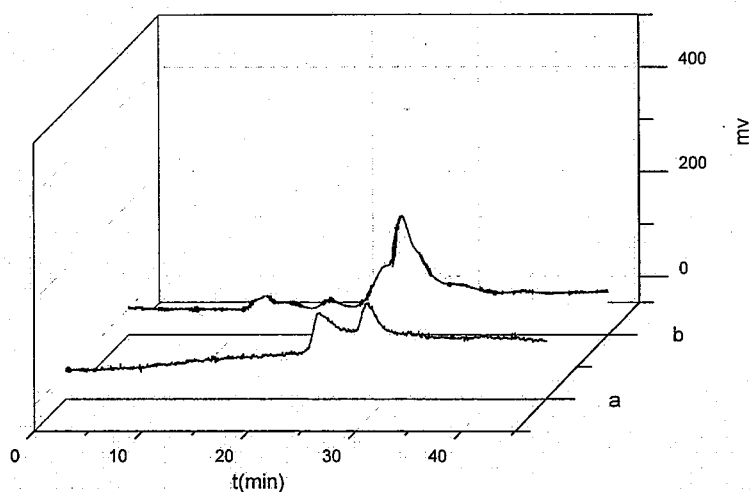


图 5-5 猪血清蛋白和胰蛋白酶抑制剂在分子印迹柱(a)和空白柱上(b)的 CEC 分离

Figure 5-5 Separation of PSA and trypsin inhibitor by CEC with MIP (a) and NIP (b) monolithic columns

Experimental conditions were the same as those shown in Fig. 5-4; sample: 0.5 mg/mL PSA and 0.5 mg/mL trypsin inhibitor, injection volume: 2  $\mu$ L

## 第二节 聚甲基丙烯酸甲酯芯片用于脂肪胺化合物的快速分离

### 5.2.1 引言

聚甲基丙烯酸甲酯 (PMMA) 芯片是一种常用的高聚物芯片, 但其表面性质复杂, 容易引起样品吸附, 导致分析结果重现性差。因此, 通道表面的修饰是微流控芯片的一个重要研究方向。通过表面修饰不仅可以调节电渗流的大小和方向, 而且能够增加通道表面的亲水性, 抑制样品吸附。PMMA 芯

片的表面修饰通常有静态修饰和动态修饰两种方法, 动态修饰方法操作简单方便, 易于实现[21,22]。

低分子量脂肪胺类化合物是一类污染物, 在塑料、染料、制药等工业生产中等都能伴随产生。同时, 该类化合物也是微生物、动物、植物新陈代谢的自然产物, 广泛存在于空气和环境水中。脂肪胺类化合物对人的皮肤、粘膜和眼睛有刺激作用, 并可以生成亚硝基胺类等致癌性化合物。因此, 对低分子量脂肪胺类的分离检测十分必要。通常采用气相色谱[23]、液相色谱[24,25]对该类化合物进行分离检测。利用毛细管电泳对脂肪胺的检测也见报道[26]。但这些方法分析时间较长, 不利于实现样品的在线快速检测。

本节利用甲基纤维素作为动态改性剂, 在PMMA芯片上对脂肪胺类化合物进行芯片电泳分离, 建立了一种脂肪胺类化合物的快速分析方法, 在90 s内实现了4种脂肪胺的快速分离。

## 5.2.2 实验部分

### 5.2.2.1 仪器与试剂

微流控芯片激光诱导荧光检测器购自浙江大学微分析系统研究所; XCDY微流控芯片智能高压电源购自山东师范大学化学系; EC2000色谱数据处理工作站购自大连依利特科学仪器有限公司。

甲基纤维素(MC)购自sigma化学试剂有限公司; 硼酸(99%)购自沈阳化学试剂厂; 三(羟甲基)氨基甲烷(Tris, 进口分装, 99%)购自沈阳医药股份有限公司; 异硫氰酸荧光素(FITC, 90%)和脂肪胺购自北京百灵威化学试剂公司; 所用水为Milli-Q纯净水, 其他试剂皆为分析纯。

### 5.2.2.2 脂肪胺的衍生

配制脂肪胺甲胺、正丙胺、正戊胺和正庚胺溶液, 浓度分别为0.98 mg/mL、0.81 mg/mL、1.66 mg/mL和1.66 mg/mL。取脂肪胺各50  $\mu$ L, 向其中加入

50  $\mu\text{L}$  硼酸钠缓冲溶液 (200 mmol/L, pH 9.0), 20  $\mu\text{L}$  FITC (10 mg/mL) 溶液, 避光反应过夜。

### 5.2.2.3 芯片区带电泳

芯片通道为十字形结构, 进样通道长度为 5.25 mm, 分离通道长度为 43.25 mm; 进样电压为 300 V/cm, 进样时间为 30 s; 半导体激光诱导荧光的激发和发射波长分别为 473 nm 和 520 nm。缓冲溶液为 Tris-硼酸盐。

## 5.2.3 结果与讨论

### 5.2.3.1 芯片动态修饰

亲水性大分子物质 MC 能够吸附到通道表面抑制电渗流, 减少通道表面对被分析物的吸附, 使分析结果重现性提高, 并减小被分析物区带在电泳过程的区带展宽, 使分离度增加。

在未加入 MC 的 Tris-硼酸缓冲溶液中对甲胺进行 PMMA 芯片电泳分析, 其峰展宽严重, 且无法重现; 在加入 0.3% 的 MC 作为改性剂后, 峰形得到了明显的改善, 五次芯片电泳出峰时间标准偏差为 0.5%。分离柱效达到 200000/米以上 (表 5-1)。

系统研究了 MC 浓度对脂肪胺混合物分离的影响。由图 5-6 可见, 随着 MC 浓度的增大, 缓冲溶液粘度增大, 出峰时间变长, 分离度增大。但柱效随 MC 的浓度增大呈现下降趋势。综合考虑, 选择 1.0% 的 MC 作为动态改性剂。

表 5-1. 甲胺芯片电泳分离的重现性

Figure 5-1. The reproducibility of the electrophoresis separation of methylamine on microchip

次数	出峰时间(min)	柱效(/m)
1	1.71	254722
2	1.70	258385
3	1.70	248947
4	1.72	232590
5	1.70	247987
相对标准偏差	0.5%	3.9%

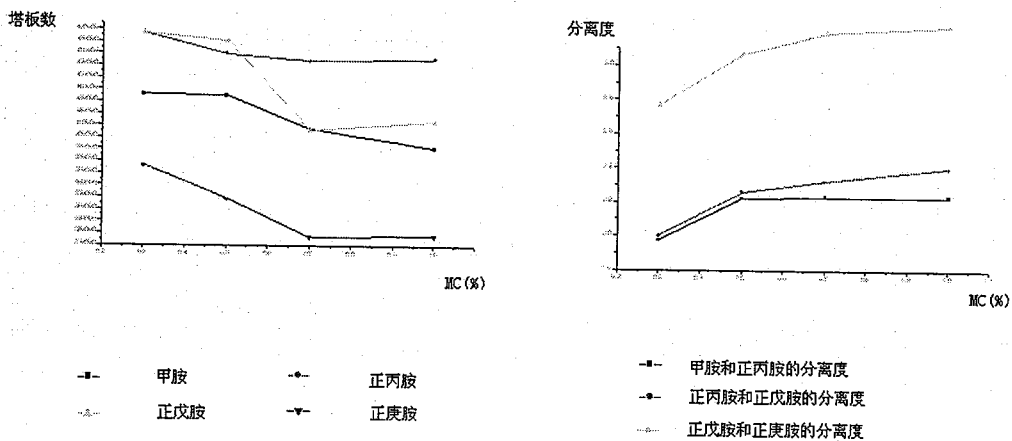


图 5-6 动态改性剂 MC 浓度对脂肪胺分离的影响

Figure 5-6 Effect of MC concentration on aliphatic amines separation

Buffer: 50 mmol/L Tris-borate, pH 8.6; separation voltage: 170 V/cm; sample concentration: 0.2  $\mu\text{g/ml}$ .

### 5.2.3.2 缓冲溶液 pH 值对脂肪胺分离的影响

在本实验所考察的 pH 值范围内 (pH 值 6~9), 衍生物中脂肪胺部分自身不带电荷, 在电泳时依靠衍生试剂 FITC 所带电荷进行电迁移。因此, 缓冲溶液 pH 值对衍生的低分子量脂肪胺类化合物分离度影响不大, 但随着 pH 值的增大, 衍生产物所带电荷增多, 其电迁移速率增大, 分析速度加快。为缩短分析时间, 选择 pH 为 8.6 的缓冲溶液为分离缓冲溶液。

### 5.2.3.3 缓冲溶液浓度对脂肪胺分离的影响

研究了缓冲溶液 Tris-硼酸的浓度分别为 20 mmol/L、50 mmol/L、100 mmol/L 时四种脂肪胺的分离情况。结果表明, 缓冲溶液浓度对四种脂肪胺的分离度影响不大。在 PMMA 芯片中, 电渗流方向为从正极到负极, 与标记后的脂肪胺电迁移方向相反。随着缓冲溶液浓度的增大, 电渗流减小, 焦耳热效应增大。因此, 在确保有效分离脂肪胺化合物的情况下, 应选择低浓度缓冲溶液。在此实验中, 选择 50 mmol/L 的 Tris-硼酸作为分离缓冲溶液。

### 5.2.3.4 分离电压对脂肪胺分离的影响

分离电压是电泳分离的重要参数。我们在实验中研究了不同分离电压对四种脂肪胺的迁移时间和分离情况的影响。结果表明, 各种分析物的迁移时间均随分离电压的增大而缩短, 但是分离电压过大会造成焦耳热影响过大, 从而影响脂肪胺的分离。因此, 分离度存在最佳值 (表5-2), 当电场强度为 300 V/cm 时达到最佳值。

表 5-2 分离电压对脂肪胺分离度的影响

Table 5-2 Effect of separation voltage on the resolution of aliphatic amines

	200 V/cm	250 V/cm	300 V/cm	350 V/cm	400 V/cm
甲胺和正丙胺	1.98	2.01	2.11	2.02	1.67
正丙胺和正戊胺	2.00	1.97	2.12	1.97	1.55
正戊胺和正庚胺	2.75	2.51	2.70	2.48	1.98

### 5.2.3.5 脂肪胺混合物的分离

综上所述,在最优化条件下,对四种脂肪胺进行了分离,结果见图 5-7,由图可以看出四种脂肪胺(甲胺、正丙胺、正戊胺、正庚胺)能够在 90 s 内得到基线分离(图 5-7)。说明该方法可以快速有效的对脂肪胺进行分离分析。

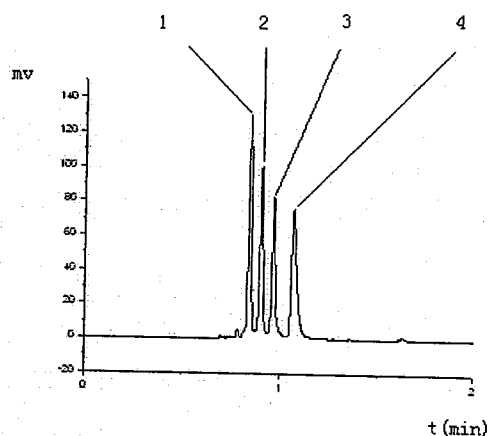


图5-7 脂肪胺混合物的芯片电泳图谱

Fig.5-7 Microchip electropherogram of aliphatic amines

Buffer: 50 mmol/L Tris-borate, pH 8.6, 1.0% MC; sample: 1. methylamine 2. propylamine 3. amylamine 4. heptyl amine, all the concentrations are 0.2  $\mu\text{g/ml}$ .

## 本章小结

1. 利用猪血清蛋白作为模板, 甲基丙烯酰胺和甲基丙烯酸作为单体, 哌嗪双丙烯酰胺作为交联剂, 制备了猪血清蛋白印迹毛细管整体柱, 并在 CEC 模式下实现了猪血清蛋白和胰蛋白酶抑制剂的分离。结果表明, 制备的整体材料对模板蛋白具有较好的选择性。
2. 采用聚甲基丙烯酸甲酯芯片, 利用甲基纤维素作为动态改性剂, 在 90 s 内完成了四种脂肪胺混合物的芯片分离。为环境样品中脂肪胺的在线检测提供了一种有效手段。

## 参考文献

1. Huo Y, Kok WT. Recent applications in CEC. *Electrophoresis*. 2008 Jan;29(1):80-93
2. Ganzera M. Recent advancements and applications in the analysis of traditional Chinese medicines. *Planta Med*. 2009 Jun;75(7):776-83
3. Boyce MC. Determination of additives and organic contaminants in food by CE and CEC. *Electrophoresis*. 2007 Nov;28(22):4046-62
4. Wang Z, Ouyang J, Baeyens WR. Recent developments of enantioseparation techniques for adrenergic drugs using liquid chromatography and capillary electrophoresis: a review. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2008 Feb 1;862(1-2):1-14
5. Okanda FM, El Rassi Z. Biospecific interaction (affinity) CEC and affinity nano-LC. *Electrophoresis*. 2007 Jan;28(1-2):89-98
6. Dolník V., Capillary electrophoresis of proteins 2005-2007. *Electrophoresis*. 2008 Jan;29(1):143-56
7. Mikšik I, Sedláková P., Capillary electrochromatography of proteins and peptides. *J. Sep Sci*. 2007 Jul;30(11):1686-703