

集成毛细管电泳芯片研究进展

金 亚, 罗国安, 王如骥

(清华大学化学系, 北京 100084)

摘要: 介绍了一种多功能化的快速、高效、高灵敏度和低耗的微型装置——集成毛细管电泳芯片的发展和最新研究动向, 引用文献 39 篇。

关键词: 集成毛细管电泳芯片; 芯片; 毛细管电泳; 微型化

中图分类号: O658, O657.7 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2000)04-0313-05

1 引言

1990 年左右, 微型全化学分析系统(μ -TAS)的概念引出了将整个实验过程集成到尽可能小的平台上完成的思想, 这样不仅减少了实验耗时和样品用量, 而且由于其实验装置体积小而轻便, 易于控制, 还适用于需要实地采样和分析的工作^[1]。近年来, 微型制造的概念和技术已越来越多地应用于化学、生物和医药分析等领域^[2-4], 预计微型制造技术将给上述领域带来革命性的变化^[5]。

毛细管电泳(CE)技术在近 10 年得到了长足的发展。由于 CE 属于电场驱动的微管分离, 且进样也能够通过电场实现, 因此相应的技术和装置就比较容易微型化, 实验条件在微型化以后变化也不大, 容易移植, 所以集成毛细管电泳芯片(以下简称 ICE 芯片)在微型装置系统的发展中是一个重要的分支。从 1991 年至今, 国际上在 ICE 芯片制作工艺方面的进展与其在生物和化学方面快速分析的应用也充分表明了毛细管电泳在微型化上的潜力和可行性。

简单来讲, ICE 芯片是在常规 CE 原理和技术的基础上, 利用微型制造技术在平方厘米级大小的芯片上刻蚀出扁平的管道和它的功能单元, 通过不同的管道网路、反应器、检测单元等的设计和布局, 实现样品的进样、反应、分离和检测, 是一种多功能化的快速、高效和低耗的微型实验装置。

2 ICE 芯片相对于传统 CE 的优点

2.1 电渗流泵的扩展应用

电渗流泵已被证明可成功地应用在 ICE 芯片

上。作为注样和分离的动力, 除使得电泳装置较易于微型化外, 其主要的优点是: 首先, 这种驱动方式不会造成明显的流体扩散, 区带展宽的主要来源是轴向扩散; 其次, 由于粒子的迁移速度与所加的电场强度基本成正比, 所以在复杂的管道网路中运送样品、注样, 实现如试剂的混合、反应和分离等多种功能, 便可以只通过电场的变化和切换来完成, 不需要其它如泵、阀门等装置, 在设计和应用上体现了很大的灵活性^[6,7]。

2.2 良好的散热性能

理论和实验都证明了在没有冷却装置的情况下, ICE 芯片上的管道能够更为有效地散热, 这是因为管道是刻蚀在玻璃或其它材质的平板状基质上的^[8], 我们实验室所制作的芯片也证明, 在能量密度达到 1.12 W/m, 电场强度达到 200 kV/m 的情况下, 伏安特性曲线仍然没有偏离线性, 这可以与带强制冷却系统的 CE 商品仪器相比。这样, 就能以比较高的分离电压对样品进行快速的分离。

2.3 设计多样化

由于使用了微型制造技术, 芯片的设计变得更为灵活, 不仅管道网路的布局可根据需要来设置, 还可以加入如柱前、柱后反应器这样的功能单元^[6,9,10], 在应用于生物样品时, 还可将聚合酶链式反应器(PCR)和连接酶链式反应器(LCR)等集成在芯片上^[11,12], 充分表现了芯片技术所希望达到的目标——芯片上的实验室(Lab on Chips)。由于装置微型, 集成度高(或正在朝这个方向努力), 因此能比较容易地与各种检测器联用。虽然到现在为止, 采用激光诱导荧光(LIF)检测的较多, 但也有相当一些研究者在如化学发光检测^[13]、质谱检测^[14-16]、紫外吸

收稿日期: 1999-07-12; 修回日期: 1999-09-06

基金项目: 国家自然科学基金重点资助项目(692350220)

作者简介: 金 亚(1975-), 女, 博士研究生; 罗国安(1946-), 男, 教授, 博士生导师。

通讯联系人: 罗国安, 电话(010)62781688, E-mail: galuo@sam.chem.tsinghua.edu.cn.

收检测^[17]和电化学检测^[5]方面得到了一些结果。另外,由于多通道设计在芯片上更容易实现,使得高通量的检测成为可能^[14,18]。

3 ICE 芯片的材质和加工工艺

到目前为止,采用过的 ICE 芯片的材质有硅片^[19]、玻璃^[20]等,其中又以玻璃材质的居多,也有采用塑料和弹性体等高分子材料的^[21~23]。石英和玻璃材质的芯片制作上主要采用类似于微电子加工及光刻与化学湿法腐蚀相结合的方法^[24],其优点是设备较简单,容易加工,缺点是湿法腐蚀是各向同性的腐蚀过程,得到的管道为扁平的梯形(上下宽度一般为几十到上百微米,深度一般为 10 μm ~ 30 μm)。还有人采用干法刻蚀,可得到高的纵宽比且尺寸更小的截面形状的电泳管道,如 Becker 等^[18]用干法刻蚀得到的管道宽 900 nm,深 3 μm ~ 6 μm。

4 ICE 芯片上的电泳模式

与常规毛细管电泳类似,在 ICE 芯片上也能采用灵活多样的电泳模式,以适应于不同的分析要求。如在毛细管区带电泳(CZE)模式下对荧光染料进行分离^[25~28],通过毛细管凝胶电泳(CGEO)对脱氧核糖核酸(DNA)样品进行分离^[22,23,29];毛细管亲和免疫电泳(IACE)^[10,30];胶束电动色谱(MEKC)^[31]。Kutter 等^[32]甚至利用特殊设计的管道网路和加电策略,进行了 MEKC 模式下的梯度洗脱(见图 1)。在类似的原理指导下,他们还在一块芯片上实现了 DNA 和限制酶的混合反应及之后碎片的分离^[7]。

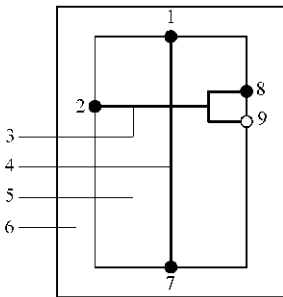


图 1 能够进行梯度洗脱的芯片

Fig.1 Schematic diagram of integrated microchip device for solvent gradients

- 1. 样品溶液; 2. 样品废液; 3. 检测点 1; 4. 检测点 2; 5. 盖片; 6. 基片; 7. 废液池; 8. 缓冲液 1; 9. 缓冲液 2.
- 1. analyte; 2. analyte waste; 3. point of detection 1; 4. point of detection 2; 5. cover plate; 6. substrate; 7. waste; 8. buffer 1; 9. buffer 2.

5 与 ICE 芯片联用的检测器

由于芯片上管道本身尺寸的微小,使得如何达到所需的灵敏度成为一个重要的问题。实际上大多数文献都采用了 LIF 检测器,能较容易地对小体积样品进行检测并得到高的灵敏度。对非荧光或不易衍生的物质,就需要用其它灵敏度较高的检测方法如电化学、化学发光检测;另外,若能与其它仪器(如质谱)联用,得到的信息量也会大大增加。

5.1 激光诱导荧光检测器

文献中使用的 LIF 检测器,其基本原理和装置大致相同,细节上有所差异。一般来说,根据研究对象的不同,分为点检测和区域检测。

5.1.1 点检测 采用光电倍增管(PMT)对发射荧光进行接收和检测。如,在 ICE 早期的工作中,Seiler 等^[27]使用了如图 2 所示的光学检测系统。PMT 检测的优点在于灵敏度很高,如罗丹明 B 和香豆素类染料的检测限可达到 μmol/L 级^[32];对血浆中的氢化可的松进行免疫电泳分析,无需对样品进行提取或其它前处理,其检测限可达到临床要求(0.1 mg/L ~ 6 mg/L)^[30];Effenhauser 等^[22]在聚二甲基硅氧烷(PDMS)材质的芯片上对 φX-174/Hae III DNA 限制酶酶解片段进行分离,其绝对检测限可达到 zmol 级,约为 2 fg。另外, Harrison 的小组使用 U 形的检测池,增加了吸收光程且能避开入射点收集荧光信号,吸收强度增加了 10 倍以上,信噪比提高了 20 倍,异硫氰酸荧光素(FITC)水解物的检测限达 3 nmol/L,相当于约 2 万个分子^[17]。

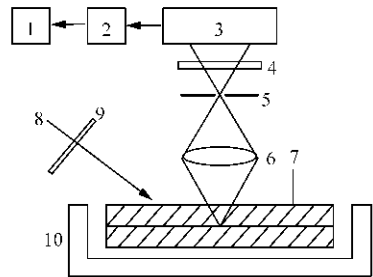


图 2 用于芯片的 LIF 装置示意图

Fig.2 Schematic diagram of the LIF detection system for chip

- 1. 计算机; 2. 电子滤波器; 3. 光电倍增管; 4. 滤光片; 5. 针孔; 6. 显微镜物镜; 7. 芯片; 8. 激光束; 9. 透镜聚焦; 10. 夹具。
- 1. computer; 2. electronic filter; 3. photo multiplier tube; 4. filter; 5. air slit; 6. microscope objective; 7. chip; 8. laser; 9. lens; 10. holder.

5.1.2 区域检测 目的主要是对所感兴趣的一个小区域进行直观的观察。一般是用激光束聚焦在感兴趣的区域(光斑直径远大于点检测),通过一定的光路,利用电感耦合器件(CCD)进行成像和观察。通过这种方式,可得到注样时样品在分离管道中的扩散情况^[6]。样品塞在分离电场作用下从注样和分离管道交叉处脱开时的形状^[33]。特定加电方式下流体的走向^[34]、溶液混合的情况^[32]等等,从而能够进行某些理论分析,并对实验进行指导。

5.2 质谱检测器

众所周知,质谱能够对痕量物质进行有效的检测,因此如果能将 ICE 芯片与质谱联用,将会大大提高 ICE 芯片的应用范围。这项技术的难点在于接口的设计。Figeys 等^[15]用一根涂层毛细管作为电渗泵管和一个金属套管作为液体接触点的设计,成功地将 ICE 芯片与一台离子阱质谱联用,并对蛋白质样品进行了分离和检测。Ramsey 等^[16]则通过一个经过化学修饰的旁路施加电压,对流体产生电渗诱导压力,使其沿通向出口处的管道前进,而后由于一个与芯片末端并不接触的导体(如质谱仪的机壳)相对于管道出口处处于更低的电位,使液体成功地从出口端喷出,进入质谱入口。他们使用典型的中性缓冲液和约 35 kV/m 的场强,电渗流的线性淌度约为 2.5 mm/s,相当于 1.5 nL/s,足够维持稳定的电喷雾。另外一个有意义的尝试由 Karger 小组^[14]作出,他们的目标是能够进行高通量的分析,以适应于实验室日常大量样品处理和药物筛选的要求。在他们的设计中,一块芯片上刻有多条平行的管道,将其放置在一个可三维移动的平台,通过在管道储液池一端和质谱仪机壳之间加电,液体顺管道前进并在出口处形成电喷雾而进入质谱。移动平台,可在另一个管道中进行下一个样品的分析。不同管道对于同种样品进行分析,能够得到相近的谱图。

5.3 电化学检测器

电化学检测一向以其灵敏度高而著称,同时,加上超微电极的广泛使用,使得 ICE 芯片与电化学检测器联用后,可望得到一个灵敏且真正集成化和微型化的分析装置。Woolley 等^[5]在 ICE 芯片上集成了三电极体系的电化学检测,其中 10 μm 的铂工作电极用溅射的方法制作在分离管道出口一端附近,处于突然扩大的检测池中(并且检测池接地,这样能够减少分离高电场对检测信号的影响)。使用这套装置,对 500 $\mu\text{g/L}$ 的 $\phi\text{X-174/HaeIII}$ DNA 限制酶消化片段和 Salmonella PCR 样品进行了分离。

5.4 化学发光检测器

化学发光检测具有高灵敏度和高选择性的特点,但常规毛细管电泳/化学发光检测器(CE/CL)的接口难以制作且容易引入死体积和湍流现象,造成分离效率下降。由于芯片上能制作柱后反应器以避免这些问题,理论上讲用 CL 对 ICE 芯片检测将是简单而有潜力的。Mangru 和 Harrison^[13]在如图 3 的芯片上,用辣根过氧化物酶(HRP)过氧化物酶-鲁米诺三元体系对其特性进行了探索,并进行了免疫分析。

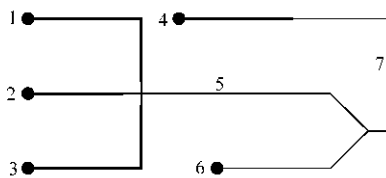


图 3 使用化学发光检测的芯片示意图

Fig.3 Schematic layout of microchip design with chemiluminescence detection

1. 样品废液; 2. 缓冲液和鲁米诺; 3. 样品(HRP); 4. 废液; 5. 分离管道; 6. 过氧化氢; 7. 反应和检测管道。

1. sample waste; 2. separation buffer & luminol; 3. sample(HRP); 4. waste; 5. separation channel; 6. peroxide; 7. reaction and detection channel.

5.5 吸收检测

由于难以设计和制作具有足够灵敏度的检测装置和结构,因而在芯片上利用吸光度进行检测的比较少。Harrison 等^[17]使用 U-型检测池,在另一端收集经过吸收的激光并进行检测,灵敏度随着光程的增加而大大增加,表现了一定的应用潜力。

6 ICE 芯片的应用

6.1 染料的分离

多数研究者在进行实际样品分离的同时,通过染料的分离对 ICE 芯片作了理论和系统性能评估方面的工作。值得注意的是,早在 1993 年,Seiler 等^[27]在十字交叉的芯片上对荧光素和荧光素 5-(和 6-)磺酸异构体的混合物进行了分离,使用低电导缓冲液体系,11 cm 的分离管道两端最大加到了 25 kV 的电压而没有出现明显的散热问题,这时能量密度已达到 1.8 W/cm,而无冷却系统的常规毛细管一般认为不应超过 1 W/cm,充分体现了 ICE 芯片在散热上的优良性能。

6.2 氨基酸的分离

Effenhauer 等^[28]首次采用双“T”形的进样结构

以增加进样量, FITC 标记的 6 种氨基酸在 15 s 内实现了很好的分离, 进样交叉处到检测窗口的距离为 24 mm, 分离场强为 106 kV/m, 塔板高度为 0.3 μm 。Harrison 等^[35]还在一块简单的十字交叉结构的芯片上, 在 4 s 内分离了 FITC 标记的 Arg、Phe 和 Glu, 其快速和高效的分离预示了 ICE 芯片广阔的发展前景。Jacobson 等^[6]还设计制作了具有柱后衍生管道的 ICE 芯片, 从旁路管道中通过巧妙的加电策略, 令邻苯二甲酰 (OPA) 衍生试剂与分离后的氨基酸以约 1:1 (体积比) 的比例在混合点处相遇并反应。

6.3 生物样品的分离

Harrison 等^[10]用一块带有柱前反应器的芯片实现了荧光标记了的牛血清白蛋白 (BSA*) 与 anti-BSA 的反应和分离。Koutny 等^[30]以荧光素作为内标, 利用高特异性的抗体-抗原反应对血浆中不同浓度的氢化可的松 (cortisol) 标准品进行了分离和测定, 分离时间小于 90 s, 其检测限达到了临床浓度, 灵敏度达到了在常规毛细管上分析的水平。Martynova 等^[21]在塑料材质的芯片上分离了 goat IgG 与 human anti-goat 抗体反应后的混合物。值得一提的是 Xue 等^[14]设计的多通道毛细管芯片与质谱联用的装置, 他们用此装置对肌红蛋白的相对分子质量进行了测定, 结果与已知值的相对偏差在 0.02% 以内, 从 ESI-MS 谱图上估计的检测限为 60 nmol/L; 同时测定的样品还包括重组的人生长激素 (recombinant human growth hormone)、脑啡肽 (endorphin) 和泛有素 (ubiquitin), 所测得的相对分子质量与已知的相对分子质量的相对偏差分别为 0.09%、0.01% 和 0.02%。Effenhauser^[29]在 1994 年首先将 CGE 移植到 ICE 芯片上, 分离了寡核苷酸混合物 PS pC(1)10-25。Jacobson 等^[7]实现了核酸内切限制酶对 DNA 的消化和分离, 在 5 min 内完成了 30 amol 的 DNA 与 2.8×10^{-3} unit 的酶消化和分离片段的全部工作。McCormick 等^[23]在塑料材质的芯片上, 在 2.5 min 内以乙基纤维素对 $\phi\text{X}-174/\text{Hae III}$ DNA 限制酶消化片段进行了筛分, 271 bp 和 281 bp 的片段得到了基线分离。Woolley 等^[5]则在集成了电化学检测器的 ICE 芯片上对多巴胺、肾上腺素和儿茶酚的混合样品、 $\phi\text{X}-174/\text{Hae III}$ DNA 的消化片段和 Salmonella PCR 产物分别进行了分离, 并对参比电极和工作电极之间距离对信号的影响进行了探讨。Woolley 等还在 ICE 芯片上实现了单色检测和四色 DNA 测序, 其中单色检测在 10 min 内检测到的片段延伸长度约为 433 bp, 四色测序在 540 s 达到单碱基识别的片段延伸长度约为 150

bp, 吻合度为 97%。这意味着 ICE 芯片不仅能识别和分离单碱基差别的片段, 而且由于芯片上能比较容易地制作出通道阵列, 还显示了 ICE 芯片作为高速、高通量 DNA 测序工具的潜力^[36]。另外, 还有研究者将 PCR 反应器集成在芯片上, 样品在完成 PCR 扩增之后, 进入分离管道进行分离和检测, 从而实现 PCR 扩增的实时监测^[11]。

6.4 其它样品的分离

Jacobson 等^[37]实现了 Zn、Cd、Al 离子在 8-羟基喹啉-5-磺酸中的分离, 分离时间小于 15 s。Zhang 等^[38]用一个可变波长的荧光显微镜作为在柱检测器, 对 5 种卟啉类化合物进行了分析。Holland 等^[39]利用芯片实现了对药理基因组的检测和药物中手性物质的拆分。

7 结论

ICE 芯片思想的提出至今不过 10 年左右, 它在高效快速的分离、高灵敏度的检测、灵活性的设计和多功能单元的集成方面的潜力吸引了众多的研究者, 成为当今的研究热点之一。芯片时代的到来很可能在分析化学领域带来革命性的变化。但芯片技术也还存在不少问题有待解决, 如缺少理论方面的研究以便对管路和功能单元设计的优化进行指导, 整个仪器的集成度还不够高, 尤其是普遍采用的 LIF 检测器还无法集成到芯片上, 与“Lab on Chips”的目标还存在很大的差距, 处理通量还不够大, 还需研究如何借助于精细加工进一步扩大芯片上管路的集成度, 芯片与其它检测器的接口设计还没有完善, 芯片材质大多还采用成本较高的玻璃或石英等等。尽管 ICE 芯片的研究还有这样多的问题, 但得益于微型制造、微流体控制乃至微型机电系统研究上已取得的成果, 它的发展前景是乐观和光明的, 并将在今后的研究中继续成为一大热点。

参 考 文 献

- Michelle M B, Jorgenson J W. *Anal Chem*, 1990, 62: 978-984
- Groves J T, Ulman N, Boxer S G. *Science*, 1997, 275: 651-653
- Volkmut W D, Austin R H. *Nature*, 1992, 358: 600-602
- Chee M, Yang R, Hubbell E, et al. *Science*, 1996, 274: 610-614
- Woolley A T, Lao K Q, Glazer A N, et al. *Anal Chem*, 1998, 70: 684-688
- Jacobson S C, Koutny L B, Hergenroder R, et al. *Anal Chem*, 1994, 66: 3 472-3 476

- 7 Jacobson S C , Ramsey J M. Anal Chem , 1996 ,68 :720-723
- 8 Harrison D J , Glavina P G. Sensors and Actuators B , 1993 , 10 :107-116
- 9 Fluri K , Fitzpatrick G , Chiem N , et al. Anal Chem , 1996 , 68 :4 285-4 290
- 10 Harrison D J , Fluri K , Chiem N , et al. Sensors and Actuators B , 1996 ,33 :105-109
- 11 Woolley A T , Hadley D , Landre P , et al. Anal Chem , 1996 ,68 :4 081-4 086
- 12 Cheng J , Shoffner M A , Mitchelson K R , et al. J Chromatogr A , 1996 ,732 :151-158
- 13 Mangru S D , Harrison D J. Electrophoresis , 1998 ,19 :2 301-2 307
- 14 Xue Q F , Foret F , Dunayevskiy Y M , et al. Anal Chem , 1997 ,69 :426-430
- 15 Figeys D , Ning Y B , Aebersold R. Anal Chem , 1997 ,69 :3 153-3 160
- 16 Ramsey R S , Ramsey J M. Anal Chem , 1997 ,69 :1 174-1 178
- 17 Liang Z H , Chiem N , Ocvirk G , et al. Anal Chem , 1996 , 68 :1 040-1 046
- 18 Becker H , Lowack K , Manz A. J Micromach Microeng , 1998 ,8 :24-28
- 19 Manz A , Harrison D J , Verpoorte E M J , et al. J Chromatogr , 1992 ,593 :253-258
- 20 Manz A , Fettingner J C , Verpoorte E M J , et al. Trends in Analytical Chemistry , 1991 ,10(5) :144-149
- 21 Martynova L , Locascio L E , Gaitan M , et al. Anal Chem , 1997 ,69 :4 783-4 789
- 22 Effenhauser C S , Bruin G J M , Paaulus A , et al. Anal Chem , 1997 ,69 :3 451-3 457
- 23 McCormick R M , Nelson R J , Aalonso-Amigo G. Anal Chem , 1997 ,69 :2 626-2 630
- 24 Fan Z H , Harrison D J. Anal Chem , 1994 ,66 :177-184
- 25 Harrison D J , Manz A , Fan Z H , et al. Anal Chem , 1992 ,64 :1 926-1 932
- 26 Hayes M A , Kheterpal I , Ewing A G. Anal Chem , 1993 , 65 :27-31
- 27 Seiler K , Harrison D J , Manz A. Anal Chem , 1993 ,65 :1 481-1 488
- 28 Effenhauser C S , Manz A , Wider H M. Anal Chem , 1993 , 65 :2 637-2 642
- 29 Effenhauser C S , Paulus A , Manz A , et al. Anal Chem , 1994 ,66 :2 949-2 953
- 30 Koutny L B , Schmalzing D , Taylor T A , et al. Anal Chem , 1996 ,68 :18-22
- 31 Moore A W , Jacobson S C , Ramsey J M. Anal Chem , 1995 ,67 :4 184-4 189
- 32 Kutter J P , Jacobson S C , Ramsey J M. Anal Chem , 1997 , 69 :5 165-5 171
- 33 Jacobson S C , Hergenroder R , Koutny L B , et al. Anal Chem , 1994 ,66 :1 114-1 118
- 34 Seiler K , Fan Z H , Fluri K , et al. Anal Chem , 1994 ,66 : 3 485-3 491
- 35 Harrison D J , Fluri K , Seiler K , et al. Science , 1993 , 261 :895-897
- 36 Woolley A T , Mathies R A. Anal Chem , 1995 ,67 :3 676-3 680
- 37 Jacobson S C , Moore A W , Ramsey J M. Anal Chem , 1995 ,67 :2 059-2 063
- 38 Zhang Y , Lee H K , Li S F Y. Talanta , 1998 ,45 :613-618
- 39 Holland L A , Chetwyn N P , Perkins M D , et al. Pharmaceutical Research , 1997 ,14 :372-387

Development of Integrated Capillary Electrophoresis Chips

JIN Ya , LUO Guo-an , WANG Ru-ji

(Department of Chemistry ,Tsinghua University ,Beijing 100084 ,China)

Abstract : Capillary electrophoresis in its different operation modes has been demonstrated that it is suitable to be integrated into a planar microdevice which is called integrated capillary electrophoresis chip (ICE chip) or microchip. The use of microfabrication and micromachining allows the integration of complex channel nets and functional units such as pre-and post-column reaction chambers on a single chip , providing good sensitivity and high separation efficiency with low reagent consumption and short analysis time. In the last 10 years an important number of publications have been reported in this area. In the present paper , the development and applications are systematically reviewed with 39 references.

Key words : integrated capillary electrophoresis chips ; microchips ; capillary electrophoresis ; microdevice