

• 研究论文 •

## 毛细管电泳微芯片在临床尿蛋白检测中的应用研究

庄贵生<sup>a,b</sup> 刘菁<sup>a,b</sup> 贾春平<sup>a</sup> 金庆辉<sup>a</sup> 王惠民<sup>c</sup>  
杨梦苏<sup>\*a</sup> 赵建龙<sup>a</sup>

(<sup>a</sup>中国科学院上海微系统与信息技术研究所 上海 200050)

(<sup>b</sup>中国科学院研究生院 北京 100049)

(<sup>c</sup>南通大学附属医院 南通 226001)

**摘要** 用微芯片毛细管电泳法对临床患者尿蛋白进行了分离, 初步探讨了用于判断肾损伤的应用前景. 以 pH 10.3, 75 mmol·L<sup>-1</sup> 的硼酸盐缓冲液作为芯片电泳缓冲体系, 利用蛋白质的紫外吸收特性, 在 210 nm 波段检测吸光度并进行信号收集和分析. 研究两种添加剂对提高尿蛋白分离效率的影响, 分析了肾病综合症、妊娠高血压症、风湿性心脏病和多发性骨髓瘤等患者尿样本, 并与美国 Helena 电泳系统分析结果对比, 得到了较一致的结果.

**关键词** 毛细管电泳微芯片; 紫外检测; 临床诊断; 尿蛋白

## Capillary Electrophoresis Microchip Assay of Clinical Urinary Proteins

ZHUANG, Gui-Sheng<sup>a,b</sup> LIU, Jing<sup>a,b</sup> JIA, Chun-Ping<sup>a</sup> JIN, Qing-Hui<sup>a</sup>  
WANG, Hui-Min<sup>c</sup> YANG, Meng-Su<sup>\*a</sup> ZHAO, Jian-Long<sup>a</sup>

(<sup>a</sup> Shanghai Institute of Microsystem and Information Technology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200050)

(<sup>b</sup> Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049)

(<sup>c</sup> Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001)

**Abstract** The separation and detection of urinary proteins have been conducted by microchip-based capillary electrophoresis (MCE), and application foreground of MCE in clinical diagnosis of various states of disease was discussed. Microchip-based capillary electrophoresis of urinary proteins could offer several advantages over standard urinary protein assay methods such as SDS-PAGE and conventional capillary electrophoresis, including the decrease of sample consumption and analysis time. The microchip used in these studies was designed to realize on-chip separation of urinary proteins with UV detection. The characteristic absorbency near 210 nm of proteins was adopted under the condition: the electrophoretic buffer at 75 mmol·L<sup>-1</sup> borate with 0.5 mol·L<sup>-1</sup> lactate at pH 10.5. Urine samples from four clinical cases were selected as target for microchip-based urinary protein assays, and the results were consistent with those of commercial Helena Rapid Electrophoreses system.

**Keywords** capillary electrophoresis microchip; UV detection; clinical diagnosis; urinary protein

微全分析系统<sup>[1]</sup> [Micro Total Analysis Systems (μTAS)]是 20 世纪 90 年代在分析化学领域发展起来的多学科交叉的新的研究方向, 它以微电子机械系统

[microelectromechanical systems (MEMS)]为基础, 以生命科学为主要研究对象, 以在不同材料的基片上设计并加工出适合生化分析的各种微管道网络为手段. μTAS

\* E-mail: jlzhao@mail.sim.ac.cn; Tel: 021-62511070-5709.

Received April 11, 2005; revised September 8, 2005; accepted October 18, 2005.

国家 863 计划(Nos. 2004AA404252, 2002AA2Z2021)资助项目.

的最终目标是实现生化分析实验室的“个人化”、“家庭化”、“便携化”，发展成为一种以芯片为平台，集成进样、样品处理、生化反应、分离、检测为一体的多功能微型检测及分析系统。

基于 MEMS 技术制作的毛细管电泳微芯片是微全分析系统中发展相对成熟的一个分支。毛细管电泳微芯片具有良好的散热性，可以外加比常规毛细管电泳更高的电场，实现样品的快速高效分离。1992 年瑞士科学家 Manz 等<sup>[2]</sup>首次报道了微芯片毛细管电泳分离技术，展示了微全分析系统的雏形和优势。近来毛细管电泳微芯片已广泛应用于无机分子、有机分子、生物大分子(如 DNA<sup>[3,4]</sup>、氨基酸<sup>[5,6]</sup>、蛋白质<sup>[7,8]</sup>)、细胞<sup>[9]</sup>、细菌及病毒等的分析检测。随着毛细管电泳微芯片研究继续深入和发展，其应用开始涉足越来越多的领域，如疾病诊断和治疗、环境监测、新药开发、食品卫生安全和司法鉴定等，作为一个交叉学科，它已成为当今生命科学、化学、微机械和微电子学领域的研究热点，其在疾病诊断方面的应用尤其受到人们的关注。

尿蛋白的电泳分离是用于肾损伤诊断和类型鉴别诊断的重要检测手段。传统的尿蛋白检测方法如免疫法，检测方法复杂，诊断试剂盒昂贵。临床上一般采用聚丙烯酰胺凝胶电泳、琼脂糖凝胶电泳以及醋酸纤维素薄膜电泳等方法，但这些方法操作繁琐，耗时长；市场上虽有自动化的仪器出售，如 Helena 的 REP 全自动电泳仪，但仪器及配套试剂价格昂贵。

我们采用 MEMS 技术制作了毛细管电泳微芯片，并利用自制的电泳微芯片尿蛋白检测仪，分析了多种肾损伤患者的尿液样本，完成每个样本的分析仅需 2 min，大大提高了分析效率，并取得了较好结果。与常用于临床的美国 Helena 公司全自动快速电泳仪检验结果对比，具有较好的一致性。

## 1 实验部分

### 1.1 试剂

免疫球蛋白(IgG)、牛血清白蛋白(BSA)、 $\alpha$ 1-抗胰蛋白酶( $\alpha$ 1-Antitrypsin)及铁传递蛋白(transferrin)购自美国 Sigma 公司；尿液样本由南通大学附属医院提供，样本经过滤和透析处理，以除去尿中杂质。SP 300 plate 琼脂糖凝胶电泳试剂盒(美国 Helena 公司)，乳酸钙(美国 Sigma 公司)，乙腈溶液，乙胺溶液(上海化学试剂公司)，pH 10.5 浓度 75 mmol·L<sup>-1</sup> 硼酸盐缓冲液实验前新鲜配制，实验过程中所用其它试剂均为分析纯，实验用水为 18 M $\Omega$ /cm 的超纯水，所配试剂在使用前用 0.22  $\mu$ m 的微孔滤膜过滤。

### 1.2 芯片设计制作

作者以往的研究已经详细论述了芯片的设计制作方法<sup>[10]</sup>，这里仅作简要说明。通过光刻显影将掩模板微管道图形转移到石英基片表面，用铬腐蚀液腐蚀去除微管道图形部分铬层后，将基片放入 40 °C 石英玻璃腐蚀液(HF:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:HAC=2:1:1, V:V:V)中腐蚀，得到电泳微通道；利用超声打孔在基片相应位置上打直径为 2 mm 的孔，作为储液池。在芯片键合前，表面经丙酮、乙醇、Piranha 洗液(H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>=4:1, V:V)严格清洗，水中贴合后转移到真空干燥箱中，进行芯片预键合，然后将预键合好的微芯片转移到箱式电阻炉中，580 °C 温度下恒温保持 3 h，自然冷却后制得电泳微芯片。图 1 所示为加工好的芯片实物照片以及芯片微管道十字交叉口的 Scanning Electron Microscope (SEM)图。整个芯片大小为 64 mm×32 mm，芯片微管道宽约 100  $\mu$ m，深约 25  $\mu$ m，有效分离长度为 42 mm。

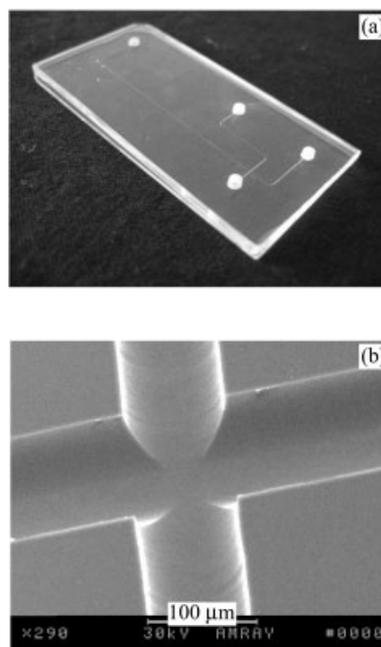


图 1 (a)尿蛋白检测微芯片；(b)十字管道扫描电镜图  
Figure 1 Microchip for on-chip detection of urinary proteins (a) and SEM image of crossing microchannel (b)

### 1.3 芯片微管道前处理

芯片初次使用前，需要对微管道进行预处理，且在使用前后均需要进行芯片处理以及管道清洗。使用前，使用中，使用后均需要用 1 mol·L<sup>-1</sup> 的 NaOH，10% 十二烷基硫酸钠(SDS)、缓冲溶液对电泳微管道进行处理，清洗。具体处理过程如下：去离子水冲洗→抽干→1 mol·L<sup>-1</sup> NaOH 注于微管道平衡浸泡 30 min→抽干→去离子水冲洗→抽干。实验前管道处理：去离子水冲洗→抽干→缓冲液冲洗→抽干→缓冲液注于微管道；实验后管道

清洗: 各储液池抽干→去离子水冲洗→抽干→10% SDS 浸泡 5 min→抽干→去离子水冲洗→抽干。

#### 1.4 微芯片尿蛋白检测系统

实验中采用的微芯片尿蛋白检测系统为自制的微芯片尿蛋白检测分析仪, 我们以前的研究已经介绍了该系统的构架, 由氙灯光源、芯片检测平台、检测光路、信号处理电路、高压电源和自行设计的专用数据采集处理软件等部分组成。该系统采用紫外吸收光度法, 该法与激光诱导荧光(LIF)方法相比, 其结构简单, 成本低, 无需对蛋白进行荧光标记。系统通过 Photomultiplier Tube (PMT)采集样品区带经检测窗口时产生的光信号变化, 并转化成电信号, 通过电路滤波、放大后进行数据自动显示存储, 得到被检样品的吸收峰谱, 实现对样品的检测。电泳过程的控制同文献[10], 采用简单进样法。

## 2 结果与讨论

微芯片分离蛋白质的难点是微管道管壁对蛋白质的吸附, 这易引起峰形拖尾且重现性差。由于患者尿液中尿蛋白<sup>[11]</sup>大部分是白蛋白和微球蛋白等酸性蛋白质, 等电点低于7, 我们采用了pH值10.5<sup>[12]</sup>的硼酸盐缓冲体系, 在此pH值下, 蛋白质带负电荷, 与管壁发生静电排斥作用, 这可降低蛋白质对管壁的吸附和区带展宽现象。采用适当的电泳添加剂也对蛋白质的管壁吸附及尿蛋白分离分析产生影响, 本文也比较了添加剂对尿蛋白电泳的影响。

### 2.1 标准蛋白质混合样品电泳分离

实验中, 我们选取纯品 IgG,  $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶( $\alpha 1$ -antitrypsin), 牛血清白蛋白(BSA)和铁传递蛋白的混合样品作为参照样品, 模拟尿中蛋白进行电泳分离。混合样品中各组分的浓度均为 3 mg/mL。

图 2 所示为纯品蛋白免疫球蛋白 G (IgG)、铁传递蛋白(transferrin)、牛血清白蛋白(BSA)和  $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶( $\alpha 1$ -antitrypsin)的混合样品(模拟血清样本)电泳分离谱图。在微管道中, 样品采取电渗流驱动的进样分离方式, 依据蛋白质的荷质比不同而导致的迁移速度不同, 实现蛋白质的分离检测。以前的研究<sup>[10]</sup>已经告诉我们, 在电渗流驱动进样的分离方式下, 蛋白的迁移速度是电泳速度和电渗流速的矢量和。电渗流一致, 带负电荷越多的蛋白质, 电泳速度越快, 受到的阻碍也越大, 在电泳谱图上的位置越靠后。BSA 等电点为 4,  $\alpha 1$ -antitrypsin 等电点为 4.8, transferrin 等电点为 5.5~6.6, 而 IgG 等电点为 8。在 pH>8 的缓冲体系下, 这些蛋白质均带负电荷, 等电点越小, 所带负电荷越多, 与微管道管壁的静电排

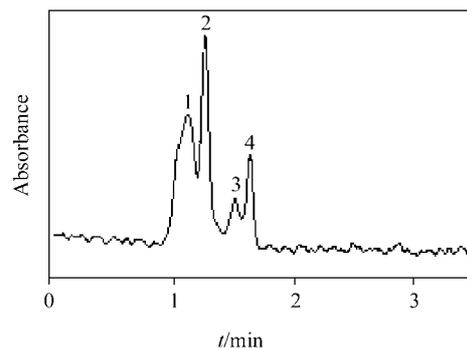


图 2 四个标准蛋白混合样本电泳图谱

(1)免疫球蛋白; (2)铁传递蛋白; (3)  $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶; (4)牛血清白蛋白

**Figure 2** Electropherogram of mixture of four standard proteins under the condition: electrophoresis buffer: (1) pH 10.5 75 mmol·L<sup>-1</sup> borate containing 0.5 mol·L<sup>-1</sup> calcium lactate, separation electric field strength: 258 V/cm, detection wavelength: 210 nm. (1) IgG; (2) transferrin; (3)  $\alpha 1$ -antitrypsin; (4) bovine serum albumin

斥作用越大, 对管壁的吸附也相对小。BSA 等电点为 4, 因此带有最多的负电荷。负电荷大, 其电泳速度也越大, 受到的阻碍也越大, 其次是  $\alpha 1$ -antitrypsin, 然后是 transferrin, 最后是 IgG, 最后总的迁移速度顺序为: IgG > transferrin >  $\alpha 1$ -antitrypsin > BSA。因此在图 2 四种纯品蛋白混合样品电泳谱图中, 峰 1 为 IgG, 2 为 transferrin, 3 为  $\alpha 1$ -antitrypsin, 4 为 BSA。

### 2.2 毛细管电泳微芯片分离临床尿蛋白

南通大学附属医院提供住院及门诊患者尿样, 尿蛋白“++”以上, 浓度在 1 mg/mL 以上。我们选取临床确诊的肾病综合症、妊娠高血压症、风湿性心脏病以及多发性骨髓瘤患者尿液作为实验样本。

#### 2.2.1 添加剂对尿蛋白样品电泳行为影响

毛细管电泳分离蛋白质时, 蛋白质对管壁的吸附是影响蛋白质分离分析的一个重要因素。为抑制和消除管壁对蛋白质的吸附, 通常采用毛细管涂层、极端 pH 或使用表面活性剂或添加剂等。在缓冲液中添加胺类(如精胺)可改善 Capillary Zone Electrophoresis (CZE)对蛋白质的分离效率。有报道在缓冲液中添加精胺, 可大大减少蛋白质与毛细管内壁间的吸附作用<sup>[13]</sup>。Jens 等<sup>[14]</sup>用毛细管区带电泳分析化疗引起的蛋白尿, 在缓冲液中添加腐胺, 减少电渗流[electroosmotic flow (EOF)], 有效提高了分离度, 蛋白峰个数增加。在本文中, 我们采用乙腈以及同属胺类的乙胺作为添加剂, 以肾病综合症患者尿液为尿蛋白分析对象, 研究并比较了这两种添加剂对芯片毛细管电泳分离尿蛋白的影响。

图 3 显示了添加剂对芯片电泳分析尿蛋白行为的影响。A 图为未加入任何添加剂的尿蛋白芯片电泳谱图,

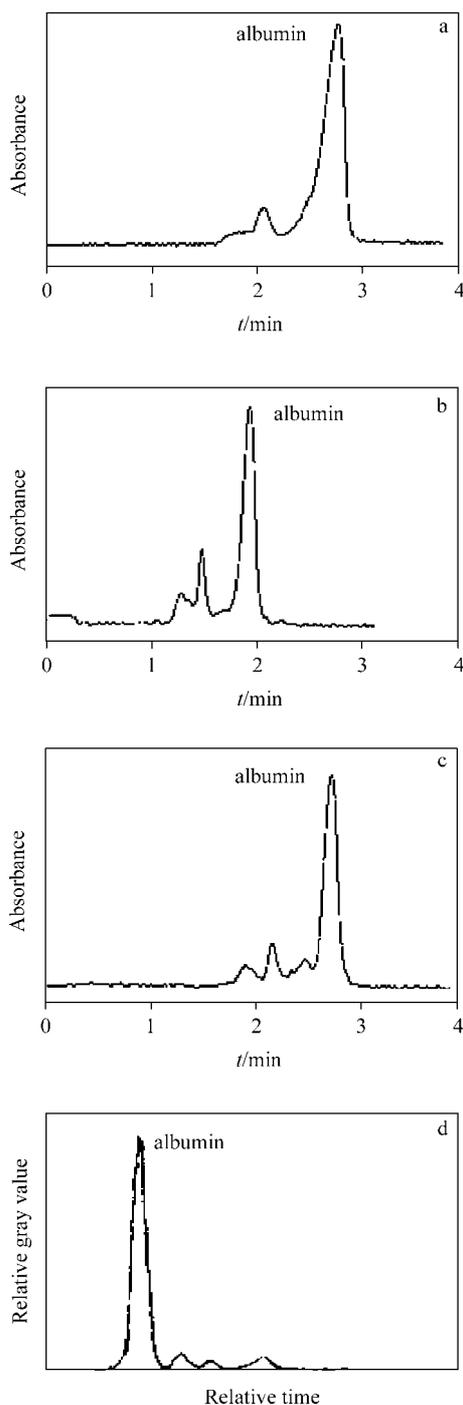


图3 添加剂对尿蛋白芯片电泳行为影响

**Figure 3** Effect of additive on-chip electrophoresis of urinary proteins: (a) no additive. (b) 1% acetonitrile. (c) 1% ethylamine. (d) electropherogram of slab-gel electrophoresis. MCE conditions:  $E_{inj}=174$  V/cm, 15 s and  $E_{sep}=194$  V/cm with electrophoretic buffer:  $75\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  borate (pH=10.5). Slab-gel electrophoresis conditions:  $E_{sep}=50$  V/cm, SP 300 plate from Helena

电泳结果出现三个蛋白峰, 但前两个峰明显没有分开, 第一个峰可能由于管壁的吸附作用, 出现拖尾现象. B 图为在缓冲液中加入 1% 乙腈的尿蛋白电泳谱图, 电泳结果也出现三个蛋白峰, 明显可以看出, 前两个峰得到

了有效分离, 第一个峰的拖尾现象得到了改善, 这是因为乙腈有降低 EOF 的趋势, 可提高分离度. C 图为缓冲液中加入 1% 乙胺的尿蛋白电泳谱图, 从图中可以看出, 谱图中出现了四个蛋白峰, 且基本达到了基线分离, 这说明乙胺对尿样的分离有很大影响. 我们比较了不同浓度乙胺作为电泳缓冲液添加剂, 对尿样电泳分离的影响, 浓度为 0.5%, 对肾病综合症患者尿样的电泳结果可出现四个峰, 浓度升高到 1% 时, 可以实现四个峰的基线分离, 而当浓度达到 2% 时, 蛋白峰的展宽严重, 不能很好地进行分离. 这些现象表明, 乙胺作为一种有机溶剂添加剂, 能抑制 EOF, 一定浓度的乙胺添加剂参与电泳缓冲液, 能有效提高分离度. D 图为采用临床上常用的平板凝胶电泳检测方法分离该肾病综合症患者尿蛋白尿样. 比较图 3 中四个图, 可以看出图 C 的结果和图 D 最相符. 因芯片电泳是利用迁移速度不同实现分离, 而凝胶电泳依据电泳速度不同实现分离, 所以二者结果中各个蛋白出峰的先后次序正好是相反的. 综合考虑, 选用  $75\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  pH 10.5 硼酸盐缓冲液、1% (V:V) 乙胺作为电泳添加剂的电泳缓冲体系分离尿蛋白.

### 2.2.2 临床尿蛋白分离

我们采用芯片电泳方法, 以优化的电泳缓冲体系分别对南通大学附属医院提供的经临床确诊的妊娠高血压患者、风湿性心脏病患者和多发性骨髓瘤患者的尿液样本进行了电泳分析. 样本在进行电泳前, 进行过滤和透析处理, 临床门诊尿常规化学分析尿蛋白为“++”以上, 浓度在  $1\text{ mg/mL}$  以上. 为与芯片电泳结果作对照, 我们采用 Helena 凝胶电泳试剂盒 (SP 300 plate) 在 Helena 快速电泳系统 (REP) 对这几个样品进行了琼脂糖凝胶电泳分析.

图 4 显示为妊娠高血压症, 风湿性心脏病等患者尿液的芯片电泳结果, A, B 二图右上图分别为该样品在 Helena 全自动快速电泳分析系统 (REP) 上进行琼脂糖凝胶电泳结果. 从临床尿蛋白诊断意义上说, 由于妊娠高血压患者血压增高, 导致肾压增高, 肾血流量增加, 从而使原尿中蛋白质含量增加, 超过了肾小管的重吸收功能, 而导致尿中有小分子蛋白质出现, 在电泳谱图中表现出球蛋白区域出现吸收峰, 如图 4 (A); 而风湿性心脏病, 由于继发引起了肾脏损伤, 导致肾小球的过滤功能下降, 使得尿中大小分子蛋白均有所增高, 在电泳谱图中表现出白蛋白及球蛋白区域出现特征吸收峰, 如图 4 (B). 从这个意义上说, 可以看出芯片电泳对两种患者尿液的诊断结果和临床 Helena 全自动快速电泳仪的诊断结果是一致的.

另一方面, 微芯片电泳完成一次分析仅需 2 min, 本研究中采用的芯片在每次使用后, 经过严格的清洗处

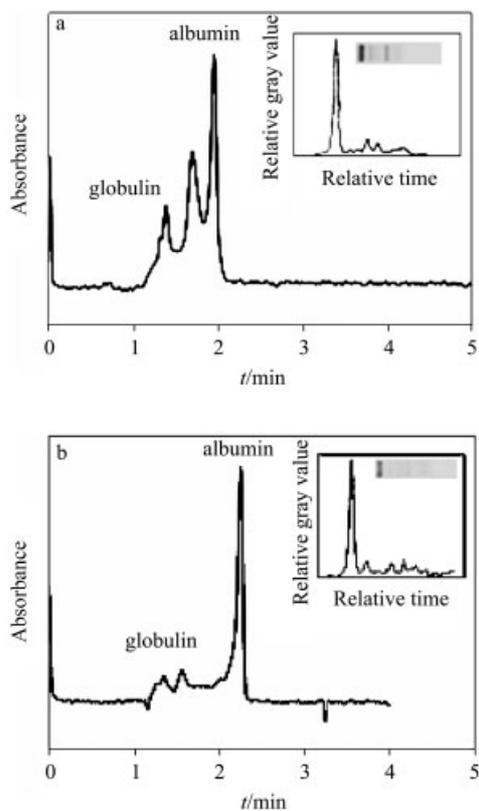


图4 临床病人尿蛋白样品芯片电泳图谱和平板凝胶电泳结果

(a)妊娠高血压症; (b)风湿性心脏病

**Figure 4** Chip-based electropherogram of clinical urine proteins and slab-gel electrophoresis using Helena REP for urinary proteins: gestational hypertension syndrome (a) and rheumatoid cardiopathy (b). MCE conditions:  $E_{inj}=174$  V/cm, 15 s and  $V_{sep}=258$  V/cm with electrophoretic buffer:  $75$  mmol·L<sup>-1</sup> borate (pH=10.5). Slab-gel electrophoresis conditions:  $E_{sep}=50$  V/cm, Helena SP 300 plate

理可以重复使用, 检测成本低; 而琼脂糖凝胶电泳进行一次实验需要至少 30 min 甚至更长, 试剂消耗量大, 采用全自动电泳仪, 如 Helena-REP, 其所配套的凝胶试剂盒昂贵, 检测成本相对高. 从此方面体现了芯片电泳在分析速度, 试剂消耗以及检测成本上的优势.

利用微芯片电泳方法对多发性骨髓瘤患者尿样进行电泳分离分析, 由于该病导致 B 淋巴细胞或浆细胞异常增高, 产生和分泌异常的单克隆免疫球蛋白, 重链和轻链生物合成不平衡, 产生过多游离的轻链小分子蛋白, 当血液流经肾小球时, 过多的轻链蛋白超过了肾小管最大重吸收率, 而从尿中排出, 因此在电泳谱图中显示为在球蛋白区域可见一特征蛋白吸收峰, 这和 Helena 的凝胶电泳结果一致(未给出). 我们对此样品连续 3 次进样分析, 得到如图 5 的谱图, 可以看出其重现性良好, 迁移时间的相对标准偏差 RSD 为 2.91%.

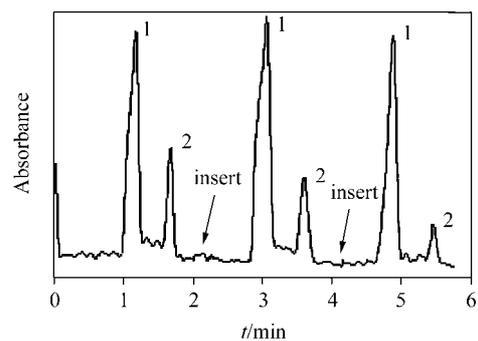


图5 多发性骨髓瘤尿液电泳重复性谱图  
(1)球蛋白; (2)白蛋白

**Figure 5** Reproducibility of urine from a multiple myeloma patient under the condition:  $E_{inj}=174$  V/cm, 15 s and  $V_{sep}=258$  V/cm with electrophoretic buffer:  $75$  mmol·L<sup>-1</sup> borate (pH=10.5). Peak (1): globulin and peak (2): albumin

### 3 结论

该文采用毛细管电泳微芯片的方法对临床患者尿蛋白进行了分离分析, 初步探讨了芯片在临床疾病诊断上的应用, 并与南通大学附属医院 Helena 全自动快速电泳系统(REP)的测试诊断结果进行了比较对照, 得出以下结论: (1)常规的尿蛋白琼脂糖凝胶电泳诊断方法耗时长且试剂消耗量大, 采用商用的 Helena-REP 系统凝胶试剂盒昂贵, 检测成本高, 而本法在这方面具有一定优势, 检测方法耗时少, 每次电泳可在 2 min 内完成, 且试剂的消耗少成本低, 采用的石英电泳芯片可以重复使用; (2)电泳添加剂对于芯片毛细管电泳分离尿蛋白具有重要的影响, 选择合适的添加剂既可降低管壁对蛋白质的吸附作用, 也可提高蛋白质的分辨率, 本文在比较之后, 选择乙胺作为电泳的添加剂.

芯片电泳在尿蛋白检测分析上的应用是微全分析系统在临床疾病诊断方面的具体应用, 随着研究的深入, 在临床上的应用价值将进一步得到体现和拓展.

### References

- 1 Manz, A.; Graber, N.; Widmer, H. M. *Sens. Actuators, B* **1990**, *B1*, 244.
- 2 Harrison, D. J.; Manz, A.; Fan, Z. H.; Luedi, H.; Widmer, H. M. *Anal. Chem.* **1992**, *64*, 1926.
- 3 Chiesl, T. N.; Shi, W.; Barron, A. E. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 772.
- 4 Lin, Y. W.; Huang, M. F.; Chang, H. F. *Electrophoresis* **2005**, *26*, 320.
- 5 Alison, M. S.; Richard, A. M. *J. Chromatogr., A* **2003**, *1021*, 191.

- 6 Masaru, K.; Yukari, G.; Kumiko, S. K.; Toshimasa, T. *J. Chromatogr., A* **2003**, 1013, 183.
- 7 Tsai, S. W.; Loughran, M.; Suzuki, H.; Karube, I. *Electrophoresis* **2004**, 25, 494.
- 8 Li, Y.; Buch, J. S.; Rosenberger, F.; DeVoe, D. L.; Lee, C. S. *Anal. Chem.* **2004**, 76, 742.
- 9 Munce, N. R.; Li, J.; Herman, P. R.; Lilge, L. *Anal. Chem.* **2004**, 76, 4983.
- 10 Zhuang, G. S.; Liu, J.; Jia, C. P.; Jin, Q. H.; Zhao, J. L.; Wang, H. M. *Acta Chim. Sinica* **2005**, 63, 1003 (in Chinese). (庄贵生, 刘菁, 贾春平, 金庆辉, 赵建龙, 王惠民, 化学学报, **2005**, 63, 1003.)
- 11 Shihabi, Z. K.; Konen, J. C.; O'Connor, M. L. *Clin. Chem.* **1991**, 37, 621.
- 12 Christa, L. C.; Shakuntala, D. M.; Harrison, D. J. *J. Chromatogr., A* **1997**, 781, 271.
- 13 Verzola, B.; Gelfi, C.; Righetti, P. G. *J. Chromatogr., A* **2000**, 868, 85.
- 14 Jens, G.; Walter, S.; Ulrich, J. *J. Chromatogr., B* **1999**, 721, 207.

(A0504114 QIN, X. Q.; FAN, Y. Y.)