

用顺序注射系统控制微流控芯片中的 Edman 降解

穆金霞, 殷学锋, 陈文章

(浙江大学化学系微分析系统研究所, 杭州 310027)

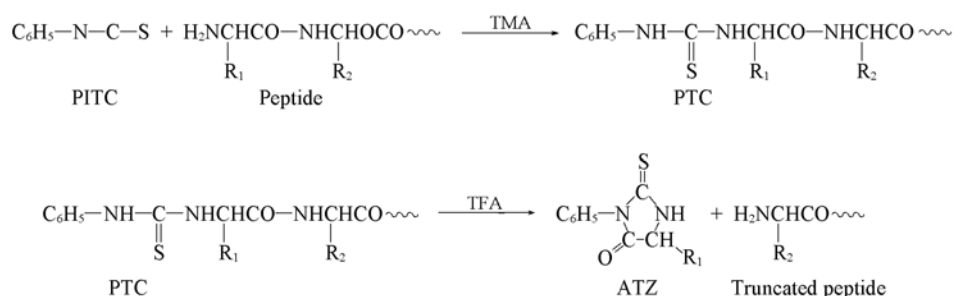
摘要 用顺序注射系统控制微流控芯片中的 Edman 降解反应, 提高了 Edman 降解的自动化程度, 得到蛋白质或多肽 N-端氨基酸残基结构的准确信息. 对固体吸附材料的选择、顺序注射程序的设计和优化及影响 Edman 降解反应的因素进行了讨论. 该控制技术在蛋白质组学的研究中有一定的应用前景.

关键词 Edman 降解; 顺序注射; 微流控芯片; 蛋白质测序

中图分类号 O657 **文献标识码** A **文章编号** 0251-0790(2008)10-1977-05

蛋白质测序被认为是生命科学中最重要的信息之一. 在质谱和化学信息学快速发展的今天, 用质谱测定肽指纹谱已成为蛋白质测序的主要方法^[1], 但测序的准确度和专属性有待改进^[2~5]. 近期的研究表明, 通过测定肽段 N 端残基的信息可以大大提高蛋白测序的准确度和专属性^[2,6,7].

Edman 降解是以化学方法从蛋白质 N 端依次切下氨基酸残基进行蛋白质测序的方法, 由偶合 (Coupling) 和裂解 (Cleavage) 二步反应组成:



在常规反应器中进行 Edman 降解, 需要蛋白或多肽的量较多, 反应时间较长^[8]. 为提高 Edman 降解测序的灵敏度, 避免试剂间的互相污染, Dovichi 等^[9]在进行 Edman 降解反应时用了 5 个注射泵来分别控制不同的试剂流过 Edman 降解反应器.

在微流控芯片中进行化学反应具有反应速度快、反应物用量少等特点^[10~12]. 近来, 我们利用微细加工技术在微通道内加工制作了 C₁₈ 固相萃取微柱^[13], 通过将多肽吸附在 C₁₈ 微柱后, 用手工的方法依次重复地将三甲胺 (TMA)、异硫氰酸苯酯 (PITC)、三氟乙酸 (TFA) 等流过 C₁₈ 微柱, 在微流控芯片中实现了 Edman 降解, 继用质谱测定 Edman 降解前后多肽的分子量, 得到蛋白质 N 端 1 个或 2 个氨基酸残基信息, 提高了蛋白质测序的准确度和专属性^[6,7].

本文用顺序注射系统与微流控芯片联用, 实现了整个 Edman 降解反应全自动化操作, 用简单的方法得到了多肽 N-端残基准确的信息. 此外, 我们还对固体吸附材料的选择、顺序注射程序的设计和优化、Edman 降解反应的温度等进行了讨论.

1 实验部分

1.1 溶液的配制

三甲胺、异硫氰酸苯酯、三氟乙酸、乙腈、正庚烷、甲醇和乙醇均为分析纯试剂.

收稿日期: 2007-12-05.

基金项目: 国家自然科学基金 (批准号: 20775072) 和浙江省自然科学基金 (批准号: Z407029) 资助.

联系人简介: 殷学锋, 男, 教授, 博士生导师, 主要从事微流控分析研究. E-mail: yinxif@zju.edu.cn

十肽(KILGPHVLGV)标样溶液:取十肽加入到1.0 mL质量分数为0.3%的三氟乙酸甲醇溶液中溶解,配成浓度为1 mmol/L的储备液,放置在-20 °C的冰箱内.使用前用去离子水稀释成不同浓度的溶液.

质量分数为4%的三甲胺(TMA)水溶液:取5 mL质量分数为24%的三甲胺水溶液加入到25 mL去离子水中,配成质量分数为4%的三甲胺(TMA)水溶液.

质量分数为1%的异硫氰酸苯酯(PITC)庚烷溶液:取0.1 mL异硫氰酸苯酯(PITC)溶液加入到9.9 mL庚烷中,配成质量分数为1%的异硫氰酸苯酯(PITC)庚烷溶液.

质量分数为80%的乙腈水溶液:取20 mL去离子水加入到80 mL乙腈中,配成质量分数为80%的乙腈水溶液.

1.2 反应装置的设计

Edman降解反应装置(图1),由顺序注射系统、带有 C_{18} 微柱的微流控芯片、自制加热器和接口组成,顺序注射系统由25 μ L注射器的注射泵SP(Kloehn 50300, Las Vegas, 美国)、三通阀 V_1 和8位选择阀 V_2 组成.用内径为0.5 mm、外径为1.5 mm的聚四氟乙烯管连接三通阀 V_1 中A端与氮气瓶出口的减压阀;由内径为0.2 mm、长度为20 cm的PEEK管作为储液管HC连接三通阀 V_1 中的B端口和8位选择阀 V_2 中间的端口.将内径为100 μ m、外径为375 μ m的石英毛细管置于内径为0.5 mm、外径为1.5 mm的聚四氟乙烯管中,在两端分别用509透明胶将毛细管和聚四氟乙烯管中间的环状部分封接,制得内径为100 μ m、外径为1.5 mm的毛细管,用它通过自制接口(图1)连接 V_2 中的端口8和微芯片反应器的进样口.

Edman降解反应所需的反应试剂均放在25 mL石英玻璃瓶中,通过内置石英毛细管的聚四氟乙烯管分别与八位选择阀 V_2 的其它端口相连接.其中端口1与质量分数为4%三甲胺(TMA)水溶液相连;端口2与质量分数为1%的PITC溶液相连;端口3与去离子水相连;端口4与庚烷相连;端口5与三氟乙酸(TFA)相连;端口6与质量分数为80%的乙腈水溶液相连.用带温控仪的自制加热块控制反应温度.用VB语言的自编软件通过计算机控制泵、阀的操作顺序、进样量及进样速度.

1.3 带有 C_{18} 微柱微流控芯片的加工

采用标准紫外光刻、湿法刻蚀和高温键合技术制作带有围堰微通道,微反应通道宽度为90 μ m,深度为25 μ m,长度为3 cm.在进行 C_{18} 装柱前,分别用2 mL的乙醇、乙腈、水冲洗芯片通道,将通道内黏附的杂质洗净.然后用乙腈溶液充满通道,再将1 μ L的 C_{18} 浆液(1 mg/mL, C_{18} 粒度为5 μ m)装入通道进样口中,用氮气(或用5 mL注射器)将 C_{18} 浆液吹入通道中,再用少量乙腈和水将 C_{18} 冲到围堰处,使其在围堰处形成长度为1.5 mm的 C_{18} 微柱.

1.4 实验过程

取1 μ L 5 μ mol/L多肽样品溶液加入到微流控芯片进样口中,用5 mL注射器压力进样,使样品溶液通过微通道,被通道内 C_{18} 柱吸附保留,然后用氮气慢慢将溶剂吹干.如图1所示,控制电热板温度为45 °C.将装有样品的微流控芯片反应器通过接口与顺序注射系统相连,用顺序注射系统按表1所列的程序分别使TMA(1~3步)、PITC(4~6步)、TMA(7~9步)、水(10~12步)、庚烷(13~15步)、TFA(16~18步)流过 C_{18} 微柱,使吸附在 C_{18} 微柱上的多肽相继发生偶合反应和裂解反应.用5 μ L水

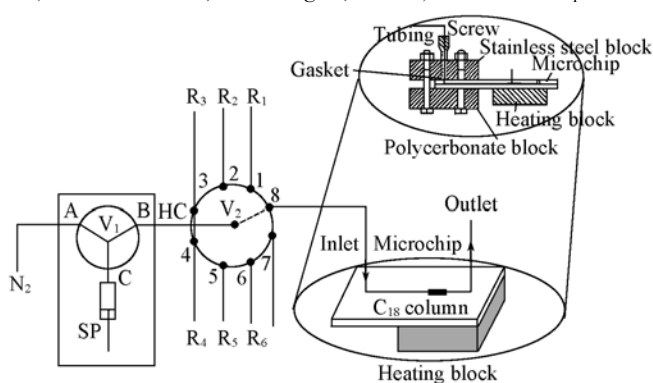


Fig. 1 Manifold of the SIA system for Edman degradation reaction

SP, syringe pump; V_1 , three-way solenoid valve; V_2 , rotary 8-port selection valve(port code 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8); HC, holding coil (20 cm, 0.2 mm i. d.); R_1 , 4% (mass fraction) TMA; R_2 , 1% PITC; R_3 , water; R_4 , heptane; R_5 , TFA; R_6 , 80% (mass fraction) acetonitrile/20% water.

将 ATZ 氨基酸洗去后, 再用 5 μL 质量分数为 80% 的乙腈水溶液将 C_{18} 微柱上切掉一个氨基酸的多肽洗脱, 用 MALDI-TOF-MS 测定其分子量. 通过计算降解前后此分子量的差值, 可以得到多肽 N 端的氨基酸信息.

Table 1 Sequencer protocol for Edman degradation

Step No.	V ₁ position	V ₂ position	SP function	Reagent solvent delivered	t/s	Function
1	C-B	1	Aspirate	4% TMA, 3 μL	3	To aspirate TMA from R ₁ into HC
2	C-B	8	Deliver	4% TMA, 3 μL	3	Deliver TMA from HC into microchannel
3	A-B	8	Stop	N ₂ blow the TMA through C ₁₈ column	120	To keep the C18 column in the desired basic environment for coupling reaction
4	C-B	2	Aspirate	1% PITC, 3 μL	3	To aspirate PITC from R ₂ into HC
5	C-B	8	Deliver	1% PITC, 3 μL	3	Deliver PITC from HC into microchannel
6	A-B	8	Stop	N ₂ blow the PITC into C ₁₈ column	60	To absorb PITC on C ₁₈ and dry C ₁₈ column by N ₂
7	C-B	1	Aspirate	4% TMA, 3 μL	3	To aspirate TMA from R ₁ into HC
8	C-B	8	Deliver	4% TMA, 3 μL	3	Deliver TMA from HC into microchannel
9	A-B	8	Stop	N ₂ blow the TMA into C ₁₈ column	300	Coupling reaction
10	C-B	3	Aspirate	H ₂ O, 3 μL	3	To aspirate H ₂ O from R ₃ into HC
11	C-B	8	Deliver	H ₂ O, 3 μL	3	Deliver H ₂ O from HC into microchannel
12	A-B	8	Stop	N ₂ blow the H ₂ O into C ₁₈ column	60	To clean up excess TMA and dry C ₁₈ column by N ₂
13	C-B	4	Aspirate	heptane, 3 μL	3	To aspirate heptane from R ₄ into HC
14	C-B	8	Deliver	heptane, 3 μL	3	Deliver heptane from HC into microchannel
15	A-B	8	Stop	N ₂	60	To clean up excess PITC and dry C ₁₈ column by N ₂
16	C-B	5	Aspirate	TFA, 3 μL	3	To aspirate TFA from R ₅ into HC
17	C-B	8	Deliver	TFA, 3 μL	3	Deliver TFA from HC into microchannel
18	A-B	8	Stop	N ₂ blow the TFA into C ₁₈ column	180	Cleavage reaction
19	C-B	3	Aspirate	H ₂ O, 5 μL	5	To aspirate H ₂ O from R ₃ into HC
20	C-B	8	Deliver	H ₂ O, 5 μL	5	Deliver H ₂ O from HC into microchannel
21	A-B	8	Stop	N ₂ blow the H ₂ O into C ₁₈ column	60	To remove phenylthiohydantoin amino acid and other by products produced during the cleavage reaction and dry C ₁₈ column by N ₂
22	C-B	6	Aspirate	80% acetonitrile/20% water, 5 μL	5	To aspirate 80% acetonitrile/20% water from R ₆ into HC
23	C-B	8	Deliver	80% acetonitrile/20% water, 5 μL	5	To elute the truncated peptides from the C ₁₈ column and spot target for MALDI-TOF-MS

2 结果与讨论

2.1 固相吸附材料的选择

聚偏氟乙烯 (PVDF) 膜是 Edman 降解反应中常用的吸附材料, 但为了将它装入微通道, 必须先用二甲基亚砜溶解. 实验结果表明, 溶解后重新固化的 PVDF 材料对多肽的吸附效果较差, 可能是由于其孔径在溶解后再装填吸附柱的过程中发生变化所致. 分别试验了石墨、纤维素膜、硅胶和 C_{18} 等固相吸附材料对多肽的吸附性能, 结果表明, 除 C_{18} 外, 其它材料对多肽的吸附效果都较差. 因此, 选用 C_{18} 作为固相吸附材料.

C_{18} 微柱会对流过的流体产生一定的阻力. 阻力的大小与 C_{18} 微柱的尺寸和 C_{18} 颗粒的粒径有关. C_{18} 颗粒过细, 会导致进样时产生很大的反压, 不利于实验反应. 在实验中选用了 5 μm 的 C_{18} 颗粒作为固相吸附材料, 微柱的长度为 1.5 mm. 用压力为 1.5×10^5 Pa 的氮气可以使储液管和连接管线中的反应试剂通过 C_{18} 微柱.

2.2 顺序注射程序的设计

为了保证顺序注射系统和微流控芯片反应器连接处的气密性,设计了特殊的接口.如图1所示,先用4个罗栓将芯片进样口一端固定在有机玻璃和不锈钢块之间,再将微流控芯片反应器的进样口通过压紧螺丝将内径为100 μm 、外径为1.5 mm的毛细管与 V_2 的端口8连接.实验结果表明,此接口在1 MPa的压力下无泄漏.

在注射泵SP的泵管内加入10 μL 水,用于密封柱塞和泵管内的间隙,通过注射泵向下移动产生的负压来吸取各试剂进入储液管HC.第1步使三通阀 V_1 中的B与C相通,八位选择阀 V_2 与端口1相通,注射泵SP从 R_1 的储液瓶中吸取3 μL 质量分数为4%的TMA溶液到储液管HC中;第2步八位选择阀 V_2 自动切换到与端口8相通,注射泵SP向上移动,将储液管HC中的3 μL TMA溶液通过八位选择阀 V_2 的端口8输送到微流控芯片的进样口;第3步三通阀 V_1 自动切换到A与B连接,氮气将芯片进样口的TMA溶液吹入通道,调节 C_{18} 微柱为碱性环境.以此类推,在4~6步中将偶联试剂PITC输送到 C_{18} 微柱上,当7~9步再次用TMA调节 C_{18} 微柱为碱性环境,吸附在 C_{18} 微柱的多肽和偶联试剂PITC发生偶合反应,生成PTC.

实验中发现,在进行偶合反应时加入过量的PITC和TMA对下一步的裂解反应有干扰,因此在偶合反应后,分别用水(10~12步)和庚烷(13~15步)将过量的TMA和PITC洗去,用氮气吹干后再在16~18步用TFA调节 C_{18} 微柱为酸性,进行裂解反应.使PTC末端与PITC偶联的氨基酸从多肽链上裂解下来,在 C_{18} 柱上留下切去顶端氨基酸残基的多肽.经19~21步洗涤、干燥后,用5 μL 质量分数为80%的乙腈水溶液将切去顶端氨基酸的多肽洗脱后,用MALDI-TOF-MS技术测定分子量.通过计算降解前后此分子量的差值,可以得到多肽的N端氨基酸的序列.

用气压将在储液管HC中微量试剂输送到 C_{18} 微柱时,如果用普通内径为0.5 mm、外径为1.5 mm的四氟乙烯管作为连接管和储液管,大部分溶液会黏附在管壁上,输送到芯片通道内的试剂量较少,加大试剂量至5~10 μL ,会将固定在 C_{18} 柱上的多肽部分洗脱,导致用MS检测降解后多肽分子量的灵敏度下降.我们将石英毛细管置于聚四氟乙烯管中,制得了将内径为100 μm 、外径为1.5 mm的连接管用于连接八位选择阀 V_2 端口8和微芯片反应器的进样口,避免了用气压输送试剂时管壁的吸附,缩短了干燥时间,防止了试剂间的互相污染.

用内径为0.2 mm、长度为20 cm的PEEK管作为储液管,用微量注射泵通过负压将各反应试剂吸入储液管中,储液管的体积约为10 μL ,大于吸入试剂的体积3~5 μL ,因此试剂不会进入注射器内.

2.3 反应速度和微流控芯片反应器的性能

温度升高反应速度加快,反应时间缩短.据文献[14]报道,在常规反应容器中于48 $^{\circ}\text{C}$ 时,偶合反应时间为12 min,断裂反应时间为6 min.

取1 μL (5 $\mu\text{mol/L}$)样品加入到微流控芯片反应器中,用电热板调节反应温度,在35 $^{\circ}\text{C}$,偶合反应需要15 min,断裂反应需要8 min;在45 $^{\circ}\text{C}$,偶合反应需要4~5 min,断裂反应只需要3 min;在60 $^{\circ}\text{C}$ 偶合和断裂反应均能在2 min内完成,但同时有副产物生成;在70 $^{\circ}\text{C}$ 时,肽链不稳定容易断裂.与文献[14]所得数值相比,芯片上缩短了反应时间,这是由于反应通道尺寸小,通道内 C_{18} 颗粒小,比表

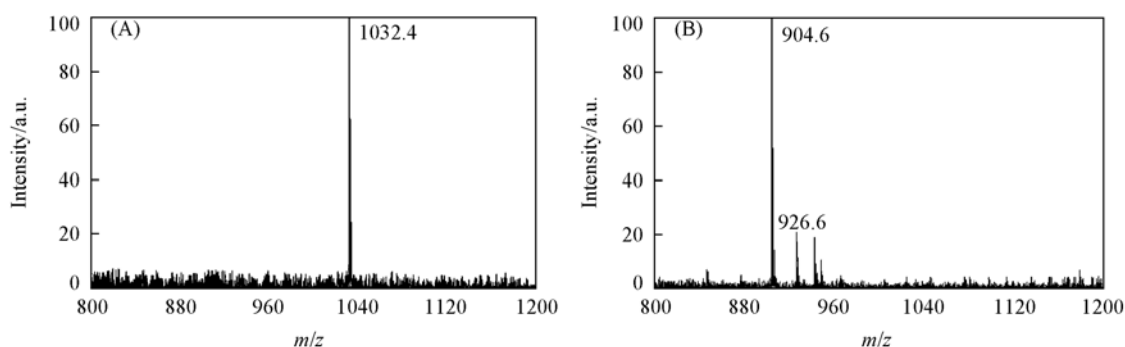


Fig. 2 Mass spectra of synthetic peptide after one cycle of Edman degradation

The signals of m/z 1032.4 (A) and 904.6 (B) correspond to the $[\text{MH}]^+$ for KILGPHVLGV and ILGPHVLGV, respectively.

面积大, 使得分子扩散距离短, 有利于反应进行. 因此选择反应温度为 45 °C, 偶合反应 5 min, 断裂反应 3 min, 对 5 pmol 的多肽样品进行实验, 质谱的检测结果见图 2. 其中图 2(A) 和(B) 的分子量差为 128, 由此可确定, 经 Edman 降解测得多肽的 N 端残基为赖氨酸, 与合成多肽的结构(KILGPHVLGV) 相符. 从图 2 还看出反应相当完全, 这主要是因为 Edman 降解的回收率通常超过 90%, 甚至在很多情况下高达 99%^[15]. 全部反应由顺序注射系统自动控制, 在 16.6 min 内完成.

3 结 论

用顺序注射系统与微流控芯片联用, 通过 Edman 降解反应得到了多肽 N 端准确的信息. 实验结果表明, 用顺序注射系统可以提高在芯片上进行 Edman 降解的自动化程度, 缩短反应时间, 减少样品用量, 在蛋白质组学的研究中有一定的实用意义.

参 考 文 献

- [1] Steen H. , Mann M. . Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. [J], 2004, **5**: 699—711
- [2] Perkins D. N. , Pappin D. J. C. , Creasy D. M. , *et al.* . Electrophoresis[J], 1999, **20**: 3551—3567
- [3] Huber L. A. . Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. [J], 2003, **4**: 74—80
- [4] Chamrad D. , Meyer H. E. . Nat. Methods[J], 2005, **2**: 647—648
- [5] States D. J. , Omenn G. S. , Blackwell T. W. , *et al.* . Nat. Biotechnol. [J], 2006, **24**: 333—338
- [6] Chen W. Z. , Yin X. F. , Mu J. X. , *et al.* . Chem. Commun. [J], 2007, (24): 2488—2490
- [7] Chen W. Z. , Yin X. F. , Yin Y. . J. Proteome Res. [J], 2008, **7**: 766—770
- [8] Hoving S. , Münchbach M. , Schmid H. , *et al.* . Anal. Chem. [J], 2000, **72**: 1006—1014
- [9] Li X. F. , Waldron K. C. , Dovichi N. J. , *et al.* . Talanta[J], 1997, **44**: 401—411
- [10] Jähnisch K. , Hessel V. , Löwe H. , *et al.* . Angew. Chem. Int. Ed. [J], 2004, **43**(4): 406—446
- [11] Brivio M. , Verboom W. , Reinhoudt D. N. . Lab on a Chip[J], 2006, **6**: 329—344
- [12] MU Jin-Xia(穆金霞), YIN Xue-Feng(殷学锋), WANG Yan-Guang(王彦广). Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报) [J], 2006, **27**(11): 2114—2116
- [13] Chen W Z. , Shen J. , Yin X. F. , *et al.* . Rapid Commun. Mass Spectrom. [J], 2007, **21**: 35—43
- [14] Henzel W. J. , Tropea J. , Dupont D. . Analytical Biochemistry[J], 1999, **267**: 148—160
- [15] Hewick R. M. , Hunkapiller M. W. , Hood, L. E. , *et al.* . J. Biol. Chem. [J], 1981, **256**: 7990—7997

Edman Degradation on Microfluidic Chip Operated with a Sequential Injection System

MU Jin-Xia, YIN Xue-Feng*, CHEN Wen-Zhang

(Institute of Microanalytical Systems, Department of Chemistry, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China)

Abstract Edman degradation reaction was carried out on microfluidic chip packed with C₁₈ beads as reaction cartridge, which was automatically manipulated by a sequential injection system. The program for sequential injection system, the column material for adsorption of protein or peptide and the temperature for Edman degradation reaction were optimized. The experiment results show that the N-terminal residue of protein or peptide can be obtained by Edman degradation on microfluidic chip with the advantages of faster reaction rate, less consumption of protein or peptide. The reported automatic method would be useful for increasing the confidence level of protein identification.

Keywords Edman degradation; Sequential injection system; Microfluidic chip; Protein sequencing

(Ed. : Y, G)