蛋白质的微芯片电泳分离及其与脱氧核糖核酸迁移规律的比较

刘春叶^{1*}, 许 旭², 张 剑³, 陈杰榕⁴

(1. 西安医学院药理学系, 陕西 西安 710021 ; 2. 中国科学院上海有机化学研究所, 上海 200032 ;

3. 中国人民解放军第二炮兵工程学院, 陕西 西安 710025 ;

4. 西安交通大学生命科学与技术学院, 陕西 西安 710049)

摘要 : 在自制的聚二甲基硅氧烷(PDMS)微芯片上 , 使用十二烷基磺酸钠(SDS)无胶筛分电泳分离体系(10 g/L 的羟乙基纤维素(HEC) , 1 g/L 的 SDS , 40 mmol/L 磷酸盐缓冲溶液 , pH 7.0) , 采用在线自校正激光诱导荧光检测方法 , 在 6.4 min 内高效分离了异硫氰酸荧光素(FITC)衍生的 6 种蛋白质标准样品 , 连续 6 次电泳所得迁移时间的相对标准偏差(RSD)均小于 10%。用自主建立的脱氧核糖核酸(DNA)定量分离模型对蛋白质迁移数据进行拟合 , 发现 SDS-蛋白质复合物迁移规律与 DNA 相似 , 但迁移淌度与相对分子质量及电场强度之间的线性关系明显变差 , 可见原 DNA 分离模型要扩展到蛋白质范围必须对一些参数进行校正。

关键词 : 自制微芯片 ; 电泳 ; 蛋白质 ; 脱氧核糖核酸 ; 迁移规律

中图分类号 : O658

文献标识码 : A

文章编号 : 1000-8713(2010)03-0296-05

Separation of proteins on microchip electrophoresis and its comparison with DNA migration

LIU Chunye^{1*}, XU Xu², ZHANG Jian³, CHEN Jierong⁴

(1. School of Pharmacy , Xi 'an Medical University , Xi 'an 710021 , China ;

2. Shanghai Institute of Organic Chemistry , Chinese Academy of Sciences , Shanghai 200032 , China ;

3. Xi 'an Research Institute of Hi - Tech. Hongqing Town , Xi 'an 710025 , China ;

4. School of Life Science and Technology , Xi 'an Jiaotong University , Xi 'an 710049 , China)

Abstract : The efficient separation of six standard proteins on a home-made poly(dimethylsiloxane) microchip with an auto-deducting background diode laser induced fluorescence detector was accomplished within 6.4 min under the sieving matrix of 10 g/L hydroxyethyl cellulose (HEC) , 1 g/L sodium dodecyl sulphonate (SDS) , 40 mmol/L phosphate buffer at pH 7.0. The experimental results showed that the reproducibility of protein separation was satisfactory and the relative standard deviations (RSDs) of protein migration time were less than 10%. The migration times of the proteins are analyzed by a quantitative mathematical model of deoxyribonucleic acid (DNA) proposed by ourselves previously. The results showed that the migration character of SDS-protein complexes was similar with DNA. However , the linear relationships between the mobilities of SDS-protein complexes and their relative molecular mass as well as electric field strength became worse , which indicated the mathematical model for DNA separation should be revised before it is used for protein separation.

Key words : home-made microchip ; electrophoresis ; proteins ; deoxyribonucleic acid (DNA) ; migration characters

在传统毛细管电泳技术发展的同时 , 微流控装置上脱氧核糖核酸(DNA)和蛋白质的高通量分离也得到了快速的发展^[1-3]。最初的微流控芯片-十二烷基磺酸钠(SDS)凝胶电泳法是将凝胶颗粒填充

在微流控芯片的通道内 , 其可在 35 s 内使相对分子质量(M_r)在 9 000 ~ 11 600 之间的 6 种蛋白质实现分离^[4] , 但该方法存在凝胶柱制备困难、使用寿命短等缺点。而无胶筛分电泳(NGS)作为凝胶电泳

* 通讯联系人 : 刘春叶 , 博士 , 讲师 , 主要研究生物分子的分离检测。 Tel : (029) 86177477 , E-mail : doris8976@163. com.

基金项目 : 中国科学院知识创新工程重大项目(KSCX1-06)和西安医学院博士科研启动基金项目(2008DOC01)。

收稿日期 : 2009-09-09

的一种替代技术,在实际中得到了更为广泛的应用。黄淮青等^[5]在非交联的葡聚糖介质中对6种SDS-蛋白质络合物进行了分离;Hatch等^[6]将蛋白质的预富集和分离集成在芯片上进行,在5 min内使蛋白质的浓度提高了1 000倍,并在交联聚丙烯酰胺介质中实现了高效分离;Oliver等^[7]在玻璃微芯片上使用聚二甲基丙烯酸酰胺(PDMA)对 M_r 在20 000~200 000之间的13种蛋白质进行了分离,并用DNA经验及半经验分离模型对蛋白质分离规律进行分析。

本文以自制的聚二甲基硅氧烷(PDMS)微流控芯片为平台,用羟乙基纤维素(HEC)作为介质对异硫氰酸荧光素(FITC)标记的6种标准蛋白质进行NGS分离。考察了方法的重现性,并对蛋白质的迁移淌度与其相对分子质量、电场强度等条件之间的关系用自主建立的DNA分离模型^[8]进行了分析;将该结果与DNA迁移规律进行比较后,对DNA分离模型直接运用到蛋白质分离后存在的偏差进行了研究并提出了校正设想。本文中用于分析蛋白质数据的DNA分离模型不同于Ogston模型、爬行模型等经验模型,属于定量模型,公式中的参数具有真实的物理意义。如果能将此分离模型扩展到蛋白质分离中,则对蛋白质构象方面的研究具有较大的意义。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

基于电荷耦合装置(CCD)的在线自校正激光诱导荧光检测装置由本实验室自行搭建^[9],该装置为具有两个伸出尖端的整体式PDMS芯片。

磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、氢氧化钠(上海联化试剂厂)及碳酸氢钠(上海试剂四厂昆山分厂)均为分析纯,FITC(美国Acros Orgnics公司),SDS、标准蛋白质(鸡蛋白溶菌酶、胰蛋白酶抑制剂、牛碳酸酐酶、兔肌动蛋白、牛血清白蛋白、兔磷酸化酶B)和二硫代苏糖醇(DTT)(华美生物工程公司),HEC(25℃时2%水溶液的黏度为200~300 mPa·s(200~300 cP),TCI公司),Sparkling蒸馏水(上海加州斯柏克林饮用水有限公司),30%(体积分数)双氧水(上海实验试剂有限公司)。

1.2 PDMS微通道的处理

PDMS芯片微通道先用乙醇和双氧水各冲洗20 min,再用蒸馏水冲洗5 min,接着对其进行HEC吸附涂层的改性^[10]。其方法简述如下:微通道用NaOH溶液等处理后,抽入10 g/L的HEC溶液(溶于40 mmol/L磷酸盐缓冲溶液,内含1 g/L的

SDS,pH 7.0),室温下平衡10 min后抽出,再于115℃下加热15 min。

1.3 蛋白质的荧光标记

采用Marshall标记法^[11]对蛋白质进行标记:称取标准蛋白质2.4 mg,加入90 μL水、30 mL碳酸钠缓冲液(0.5 mol/L,pH 9.5),摇匀,缓慢滴加60 μL FITC溶液(1 mg/mL,新鲜配制),混合后置于冰箱中于4℃条件下反应24 h。反应结束后分装在小管中,置于-20℃保存。室温融化后,取一定量的标记样品加入到样品缓冲溶液(0.06 mol/L Tris-HCl,1 g/L SDS,50 g/L DTT,pH 6.6)中,沸水浴中加热10 min,稀释60倍后进行电泳分离。蛋白质与SDS的质量比为1:4,保证蛋白质与SDS充分结合。

1.4 微芯片电泳条件

HEC涂层改性过的PDMS微芯片,通道总长19.0 cm,有效长度12.0 cm;电泳缓冲液:40 mmol/L磷酸缓冲液(pH 7.0),10 g/L HEC,1 g/L SDS,进样:-5.0 kV×5 s;分离电压5 000 V。

2 结果与讨论

2.1 标准蛋白质的无胶筛分

在经过涂层处理的PDMS微芯片上对SDS-蛋白质复合物进行分离,发现分离效果较差(见图1a)。由此可见,虽然SDS在一定程度上抑制了管壁对蛋白质的吸附,但是吸附问题在蛋白质分离实验中仍然存在,并且决定着分离效果。因此,采用1.2节所述的管壁改性方法对PDMS微通道进行修饰后再进行标准蛋白质的分离实验,在6.4 min内实现了6种标准蛋白质的分离(见图1b)。结果显示,改性后的微芯片对蛋白质的分离效果显著提高。鸡蛋白溶菌酶、胰蛋白酶抑制剂、牛碳酸酐酶、兔肌动蛋白、牛血清白蛋白、兔磷酸化酶B等6种蛋白质迁移时间的相对标准偏差(RSD)($n=6$)分别为8.4%、4.9%、9.6%、8.3%、7.4%、4.7%,由此可见,该方法重现性较好。图2为连续运行不同次数的HEC涂层PDMS芯片分离6种蛋白质的电泳谱图,其中第2次运行分离时电泳峰的最大理论塔板数为107 591/m,第7次运行分离时为10 286/m,而第11次运行分离时为5 324/m;第2次运行分离时理论塔板数高于10 000/m的电泳峰有4个,而第7次运行分离时只有1个,而第11次运行分离时所有电泳峰的理论塔板数均小于10 000/m,表明连续运行11次后分离效率有所下降,需再次进行涂层操作。采用该涂层方法后,标准蛋白质的分离效果显著提高,

且涂层的使用寿命较长(约为 $2 \text{ h}^{[10]}$),因此经过 HEC 改性过的 PDMS 微芯片可以用于蛋白质的分离。

图 1 SDS-蛋白质复合物在 (a) 未经 HEC 涂层处理和 (b) 经 HEC 涂层处理的 PDMS 微芯片上的电泳分离谱图

Fig. 1 Electropherograms of SDS-protein complexes on (a) without HEC-coated and (b) HEC-coated PDMS microchips

Peak identifications : 1. hen egg white lysozyme ; 2. trypsin inhibitor ; 3. bovine carbonic anhydrase ; 4. rabbit actin ; 5. bovine albumin ; 6. rabbit phosphorylase B.

图 2 运行不同次数的 HEC 涂层 PDMS 芯片电泳分离 SDS-蛋白质复合物的电泳谱图

Fig. 2 Electropherograms of SDS-protein complexes separated on a HEC-coated PDMS microchip from different runs

由于 NGS 在分离机理上传统的聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 相似,故仍可使用传统的经验公式推算蛋白质的 $M_r^{[12]}$: $t_m = a + b \ln M_r$, 式中 t_m 为蛋白质的迁移时间 a, b 均为实验常数。

实验中所用标准蛋白质 M_r 范围为 $14\,400 \sim 97\,400$, 用 t_m 对 $\ln M_r$ 作图,得到图 3。SDS-蛋白质复合物的 t_m 和 M_r 对数呈线性关系,具体表达为公式 (1)。在本论文所采用的实验条件下,SDS-蛋白质复合物在 NGS 中的迁移规律与在传统的 SDS-

PAGE 中的迁移规律相似,也是按照相对分子质量的大小进行分离。

$$t_m = -11.94 + 3.54 \ln M_r \quad (1)$$

其中 3.54 和 -11.94 均为平均值。

图 3 SDS-蛋白质复合物迁移时间与相对分子质量之间的线性关系图

Fig. 3 Migration times of SDS-protein complexes against their relative molecular masses

2.2 蛋白质与 DNA 迁移行为的比较

文献 [8] 中所建立的 DNA 定量分离模型为:

$$\frac{1}{\mu} - \frac{1}{\mu_0} = \frac{EN_A \pi L_p t_c C_p^{\frac{1+a}{3a}}}{M_p k} \cdot [f_E (5.66 \times 10^{-14} M_{DNA})^{1/2} + k C_p^{-\frac{1+a}{3a}}]^2$$

其中 μ 为 DNA 迁移淌度 μ_0 为 DNA 在自由溶液中的迁移淌度 E 为电场强度 (V/cm), N_A 为阿佛加德罗常数 L_p 为聚合物的伸直链长 M_p 为聚合物的相对分子质量 C_p 为聚合物质量浓度 (g/mL), t_c 为平均碰撞延迟时间 f_E 是一个关于场强的反函数 M_{DNA} 为以 bp 表示的 DNA 片段长度 a 为聚合物体系的特性常数 $k = 1.43 (K/6.2 N_A)^{1/3} (K/1.5)^{-(1+a)/3a}$, K 为聚合物的特性常数。在聚合物浓度及电场强度一定的条件下, DNA 迁移淌度与其 M_r 之间的关系可以表示为公式 (2), 其中 K_1, K_2 为常数。

$$\sqrt{\frac{1}{\mu} - \frac{1}{\mu_0}} = K_1 M_{DNA}^{1/2} + K_2 \quad (2)$$

用 $M_{protein}$ 代替 M_{DNA} , 将标准蛋白质的分离数据用公式 (2) 进行拟合, 得到图 4。由图 4 可见, 在固定场强 (263 V/cm) 下, SDS-蛋白质复合物在 HEC 介质中进行分离时, 其迁移淌度与相对分子质量之间的关系为一条弯曲的凸形曲线。实际上, SDS 可以破坏蛋白质分子中的氢键和疏水键, 使蛋白质分子或亚甲基的多肽链处于展开状态。SDS-蛋白质复合物的形状被认为是具有相似形状的长椭圆棒状, 所以分离模型中对 DNA 在垂直于电场方向的

回旋半径 $R_{\text{DNA},Y}$ 的计算公式 $R_{\text{DNA},Y}(\text{cm}) \approx f_E (5.66 \times 10^{-14} M_r)^{1/2}$ 不再适用于 SDS-蛋白质复合物。对于不同的蛋白质-SDS 复合物,椭圆棒的短轴基本上是相同的,约为 1.8 nm ($18\text{ \AA}$)。但长轴的长度则与亚基的 M_r 大小成正比,因此电泳迁移率取决于椭圆棒的长轴长度,即蛋白质或亚基的 M_r 大小。蛋白质以这种椭圆棒构型在交联聚合物溶液中进行迁移时与聚合物之间的不断碰撞使其电泳时间得到延迟。蛋白质的 M_r 越大,碰撞次数越多,延迟时间越久,迁移时间越长;反之亦然。但如何将此结论与蛋白质回旋半径 $R_{\text{protein},Y}$ 的计算公式相联系,并对此公式进行校正还需要研究,另外,本研究使用的是 FITC 标记的 SDS-蛋白质复合物,蛋白质在荧光标记前后其性质也有可能发生改变,但蛋白质迁移机理与 DNA 基本相似。由此可见,上述 DNA 分离模型需进一步进行修正和补充才能适用于蛋白质。

图 4 SDS-蛋白质复合物迁移淌度与其相对分子质量之间的线性关系

Fig. 4 Mobility of SDS-protein complexes against their relative molecular masses

2.3 电场强度对分离的影响

本文还考察了电场强度对 SDS-蛋白质复合物分离结果的影响。电场强度由 368 V/cm 变化至 526 V/cm (施加电压由 7 kV 变化至 10 kV),电泳谱图见图 5。从图 5 中可以看出,电场强度越高,蛋白质的迁移速度越快。

如图 5 所示,场强为 526 V/cm 时 4 min 内即可完成蛋白质的分离。但图 4 中蛋白质的分离效果低于图 2,这可能是高场强下产生较大的焦耳热造成扩散所致。将 SDS-蛋白质复合物的分离数据用 DNA 迁移模型中反映 DNA 迁移淌度与电场强度之间关系的公式(3)进行处理,其中 A 、 B 均为常数,结果见图 6。可以看出,SDS-蛋白质复合物迁移淌度与电场强度的对数($\ln E$)之间不再遵循线性关系,而是变成一条外凸的曲线,这可能与图 4 中线性偏离的原因相似。

$$\frac{\sqrt{\frac{1}{\mu} - \frac{1}{\mu_0}}}{E^{1/2}} = A \ln E + B \tag{3}$$

图 5 不同场强下 SDS-蛋白质复合物的电泳谱图

Fig. 5 Electropherograms of SDS-protein complexes separated under different electric field strengths

图 6 SDS-蛋白质复合物迁移淌度与电场强度之间的关系

Fig. 6 Mobility of SDS-protein complexes vs. the electric field strength

3 结语

本文实现了荧光标记的 SDS-蛋白质复合物在改性后的 PDMS 芯片上的快速分离。与毛细管电泳相比,芯片上的分离更加快速。在电场强度为 263 V/cm 、分离长度为 12.0 cm 条件下,可以在 6.4 min 内完成对 6 种标准蛋白质的分离,且方法的重现性良好,迁移时间的 RSD 值均小于 10% 。用我们先前建立的 DNA 定量分离模型来分析 SDS-蛋白质

复合物的迁移规律,发现 SDS-蛋白质复合物迁移规律与 DNA 相似,但线性关系明显变差,迁移淌度与相对分子质量及电场强度之间的直线关系变为上凸型,这可能是由于 SDS-蛋白质复合物构型不再符合 DNA 模型的假设条件所致,需对 DNA 回旋半径等参数进行校正后使其适用于蛋白质分离,这对蛋白质构象方面的研究具有较大意义。模型中相关参数的修正将在下一步的工作中进行深入研究。

参考文献：

- [1] Zhang J , Hoogmartens J , Van Schepdael A. Electrophoresis , 2006 , 27 : 35
 - [2] Meagher R J , Coyne J A , Hestekin C N , et al. Anal Chem , 2007 , 79 : 1848
 - [3] Xu X , Takai M , Konno T , et al. Lab on a Chip , 2007 , 7 : 199
 - [4] Yao S , Anerx D S , Caldwell W B , et al. Proc Natl Acad Sci 53(4) : 171
 - [11] Mo X M , Huang C B , Liu Q L. Journal of Analytical Science (莫小曼 , 黄春保 , 刘巧玲. 分析科学学报) , 2004 , 20 (5) : 528
 - [12] Liang H , Wang S J , Wang S Q , et al. Journal of Xi ' an Jiaotong University : Natural Science (梁恒 , 王世驹 , 王素琴 , 等. 西安交通大学学报 : 自然科学版) , 1998 , 32(1) : 76