

微流控芯片电泳分离血清高密度脂蛋白亚类的研究*

郑慧斐^{1, 2)} 丛 辉¹⁾ 王惠民^{1)**} 金庆辉^{2)**} 赵建龙²⁾

(¹⁾ 南通大学附属医院检验医学中心, 南通 226001; ²⁾ 中国科学院上海微系统与信息技术研究所, 上海 200050)

摘要 描述了一种微流控芯片电泳快速分离血清高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)亚类的方法。利用自制的微流控芯片, 结合激光诱导荧光检测系统, 40 mmol/L Tricine、50 mmol/L 甲基葡胺(MEG)、0.2 mmol/L SDS (pH 8.5)为样品缓冲液, 40 mmol/L Tricine、50 mmol/L MEG、0.01 mmol/L SDS (pH 8.5)为分离缓冲液, 4 min 内 HDL₃ 和 HDL₂ 两种亚类得到基线分离。该法操作过程简单, 重复性较好, 测试费用低廉, 在临床 HDL 亚类的检测中具有较好的应用前景。

关键词 微流控芯片电泳, 高密度脂蛋白, 分析

学科分类号 R446, R446.11+2

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00506

高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)是一种由脂质和蛋白质构成的, 在形状、密度、颗粒大小、电荷和理化特性等方面都具有较大异质性的脂蛋白, 它参与胆固醇逆运转, 具有抗动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)作用^[1]。HDL 亚类成分可以作为评估 AS 的危险因素, 与冠心病(coronary heart disease, CHD)密切相关, 但对于亚类 HDL₂ 和 HDL₃ 的相对重要性问题在临床上一直存在分歧, 国际上仍未得到统一认识, 其中一重要原因是因为缺乏简易、准确的 HDL 亚类分析方法。

微流控芯片电泳能够快速高效分离分析 DNA^[2]、氨基酸^[3]、蛋白质^[4]、细胞^[5]等, 分离效率高、重复性好。本研究利用自制的石英芯片结合激光诱导荧光(laser induced fluorescence, LIF)检测系统, 在本研究组前期研究基础上^[6]进一步改良, 可简便、高效分离出 HDL 亚类, 并对健康体检者和 CHD 患者血清标本进行分析, 初步探讨了微流控芯片电泳用于 HDL 亚类分析的临床应用价值。

1 材料和方法

1.1 标本来源

南通大学附属医院经冠状动脉造影证实的 CHD 患者、排除心脑血管疾病及其他影响血脂代谢疾病的健康体检者。

1.2 试剂与仪器

1.2.1 试剂. 浓度为 15.5 g/L 的 HDL 标准品、Tricine、甲基葡胺(N-methyl-D-glucamine, MEG)、十二烷基硫酸钠(SDS)、乙二醇、甲醇、磷钨酸(phosphotungstic acid, PTA)、氯化镁(MgCl₂)、溴化钾(KBr)均购于美国 Sigma 公司; 硝基苯并噁二唑 -C₆- 酰基鞘胺醇(NBD C₆-ceramide)购于美国 Molecular Probes 公司; 沉淀剂按照中华医学会检验学分会推荐的 PTA-Mg 沉淀法中描述配制^[7] (1.52 mmol/L PTA、0.05 mol/L MgCl₂, pH 6.1); 样品缓冲液由 40 mmol/L Tricine、50 mmol/L MEG、0.2 mmol/L SDS (pH 8.5)组成; 分离缓冲液由 40 mmol/L Tricine、50 mmol/L MEG、0.01 mmol/L SDS (pH 8.5)组成。所用试剂均为分析纯, 配制试剂用水为二次蒸馏水, 试剂配置好后均用 0.22 μm 的滤膜过滤。

* 国家高技术研究发展计划(863)(2007AA042106), 国家重点基础研究发展计划(973)(2007CB714502, 2007CB936000), 卫生部重大专项(2009ZX10004-301, 2009ZX10004-505), 江苏省医学重点建设学科资助(XK200723), 南通市社会发展计划(S8919, S2009012)资助项目和上海市科委项目(08110700200, 0752nm021)。

** 通讯联系人。

王惠民. Tel/Fax: 0513-85052102, E-mail: ntfjyk@pub.nt.jsinfo.net

金庆辉. Tel: 021-62511070-8703, E-mail: jinqh@mail.sim.ac.cn

收稿日期: 2009-08-25, 接受日期: 2009-12-08

1.2.2 仪器. LIF 检测系统(自行研制^[8]); Optima™ L-90K 型超速离心机(美国贝克曼公司); 7600-020 全自动生化分析仪(日本日立公司); CX 系统电源(0~5 000V)(中国科学院上海应用物理研究所).

1.2.3 自制芯片. 石英玻璃经光刻、湿法腐蚀、高温键合而成^[9], 结构见图 1. 整个芯片大小为

64 mm×32 mm, 芯片微管道宽 100 μm, 深约 25 μm, 芯片样品池到十字交叉点长 4 mm, 有效分离长度为 42 mm, 储液池的直径为 2 mm. 样品池 1 和样品废液池 2 间通道用于进样, 缓冲液池 3 和缓冲液废液池 4 间通道用于电泳分离.

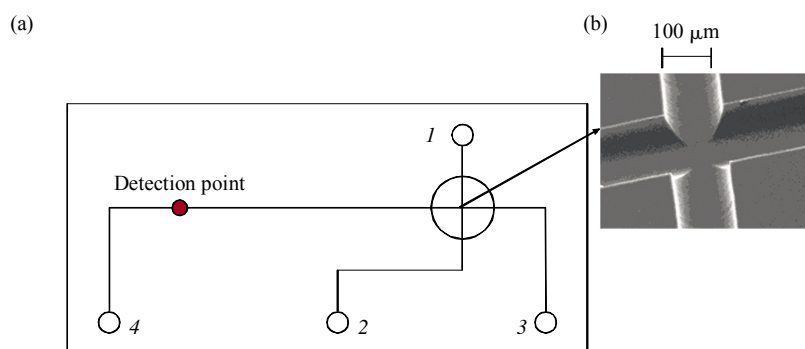


Fig. 1 Structure for the microchip

(a) Chip. (b) The SEM photograph for the cross-point channel. 1: Sample reservoir; 2: Sample waster reservoir; 3: Buffer reservoir; 4: Buffer waster reservoir.

1.3 方法

1.3.1 标本准备. 受试者素食 3 天后, 清晨空腹采血 3 ml, 以 3 000 r/min 离心 10 min 后分离血清, 所取血清标本加入同体积沉淀剂, 充分混匀, 置室温 15 min 后 3 000 r/min 离心 15 min, 离心后吸出上清液供测定. 要求 4 h 之内完成分离检测, 或 -70℃ 保存. HDL 标准品预处理过程: 1 μl HDL 标准品加入 10 μl 去离子水, 再加入 4 μl 0.2 g/L NBD C₆-ceramide(以 $v(\text{乙二醇}):v(\text{甲醇})=9:1$ 混合液预先溶解)避光预染 1 min, 最后加入 60 μl 样品缓冲液. 血清标本预处理过程: 6 μl 预测血清加入 2 μl 去离子水, 再加入 4 μl 0.2 g/L NBD C₆-ceramide 避光预染 1 min, 最后加入 20 μl 样品缓冲液.

1.3.2 电泳过程. 在芯片样品废液池、缓冲液池、缓冲液废液池中加入分离缓冲液, 并使通道内充满分离缓冲液. 在样品池中加入样品, 使激光束聚焦于芯片分离通道下检测点处. 按下列程序分别向 4 个储液池施加电压, 进行进样和分离操作: 进样 45 s, 样品池、样品废液池、缓冲液池、缓冲液废液池分别施加 760 V、0 V、300 V 和 450 V 电压; 分离 4 min, 样品池、样品废液池、缓冲液池、缓冲液废液池分别施加 500 V、500 V、3 500 V 和 0 V 电压. 运行温度 25℃, 分离电场强度为 450 V/cm.

1.3.3 电泳原理. 石英芯片微通道表面在缓冲液是碱性的情况下, 硅羟基解离产生负电荷, 缓冲液中阳离子在芯片管壁负电荷表面形成一圆筒形的阳离

子鞘, 在外加电场作用下, 携带溶剂一齐向阴极迁移, 便形成电渗流. 管道中 HDL 亚类的迁移速度是外加电场、溶剂阻力与电渗流作用的结果, 由于电渗流的作用通常大于带电粒子所受电场力作用, 所以样品粒子在管道进行与电渗流方向一致的差速迁移. 最后通过末端检测器的检测并记录得到电泳图谱.

1.3.4 统计分析. 采用 SPSS 11.0 软件进行统计学处理, 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表达. 组间差异比较使用方差分析, $P < 0.05$ 有显著性差异.

2 结 果

2.1 HDL 亚类的峰型鉴定

HDL 标准品的电泳图谱见图 2, HDL 被分为 2 个区带(a, b 区带), 其出峰时间分别为 1.5 min 和 1.8 min, 4 min 内完成分离. 根据 Havel 等^[10]报道的超速离心法制备 HDL₂ 和 HDL₃, HDL₂ 加入到分析样品中 b 区带明显增高、面积增大, 见图 3; HDL₃ 加入到分析样品中 a 区带明显增宽、面积增大, 见图 4. 可以判定快速迁移峰 a 为 HDL₃, 慢速迁移峰 b 为 HDL₂.

2.2 沉淀剂处理前后血脂水平的测定

表 1 为随机选取一健康体检者血清标本, 生化分析仪测得的沉淀剂处理前后血脂水平. 沉淀剂处理后血清被 2 倍稀释, 所以处理后测得指标乘以 2.

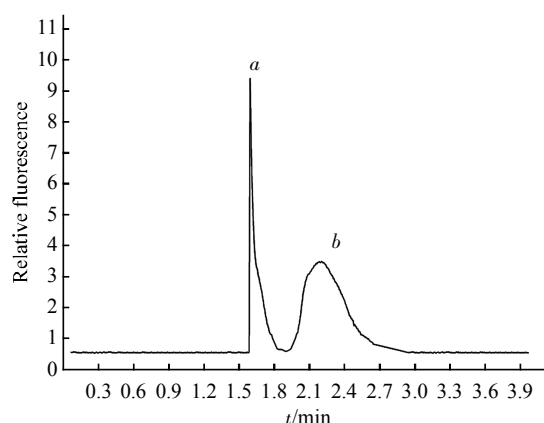


Fig. 2 Electropherogram of the separation of standard HDL

The injection concentration of HDL was 80 $\mu\text{mol/L}$. Separation conditions: Sample buffer solution contained 0.2 mmol/L SDS, 40 mmol/L Tricine, 50 mmol/L MEG at pH 8.5. Separation buffer solution contained 0.01 mmol/L SDS, 40 mmol/L Tricine, 50 mmol/L MEG at pH 8.5, with E at 450 V/cm.

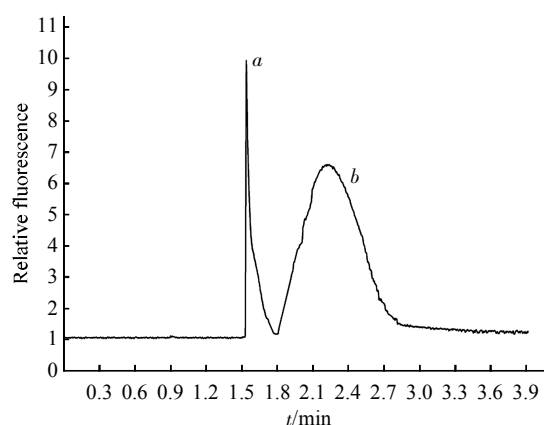


Fig. 3 Electropherogram of the mixtures of standard HDL and 2 μg HDL₂

Separation conditions were the same as described in Figure 2.

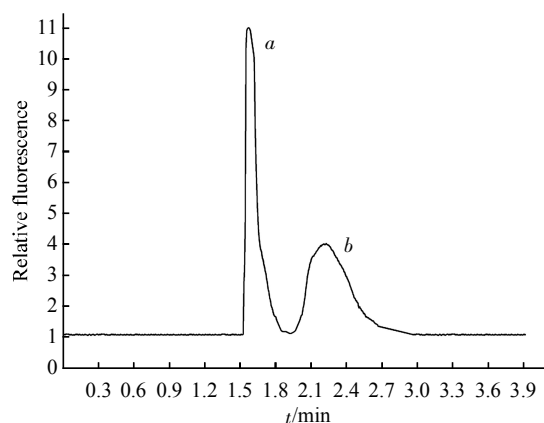


Fig. 4 Electropherogram of the mixtures of standard HDL and 2 μg HDL₃

Separation conditions were the same as described in Figure 2.

Table 1 The serum lipid levels of healthy subjects before and after the serum treated by precipitating agent

Indicator	Before treated by precipitating agent	After treated by precipitating agent $\times 2$
c (High density lipoprotein-cholesterol)/(mmol $\cdot\text{L}^{-1}$)	1.87	$0.93 \times 2 = 1.86$
c (Low density lipoprotein-cholesterol)/(mmol $\cdot\text{L}^{-1}$)	3.04	0
ρ (Apolipoprotein A1)/(mg $\cdot\text{L}^{-1}$)	1980	$980 \times 2 = 1960$
ρ (Apolipoprotein B)/(mg $\cdot\text{L}^{-1}$)	830	$10 \times 2 = 20$
ρ (Lipoprotein (a))/(mg $\cdot\text{L}^{-1}$)	280	0

2.3 临床血清 HDL 的分析

图 5、图 6 分别为健康体检者和 CHD 患者血清标本连续 3 次电泳分离结果. 全自动生化分析仪测得 HDL-C 浓度分别为 1.78 mmol/L 和 0.56 mmol/L.

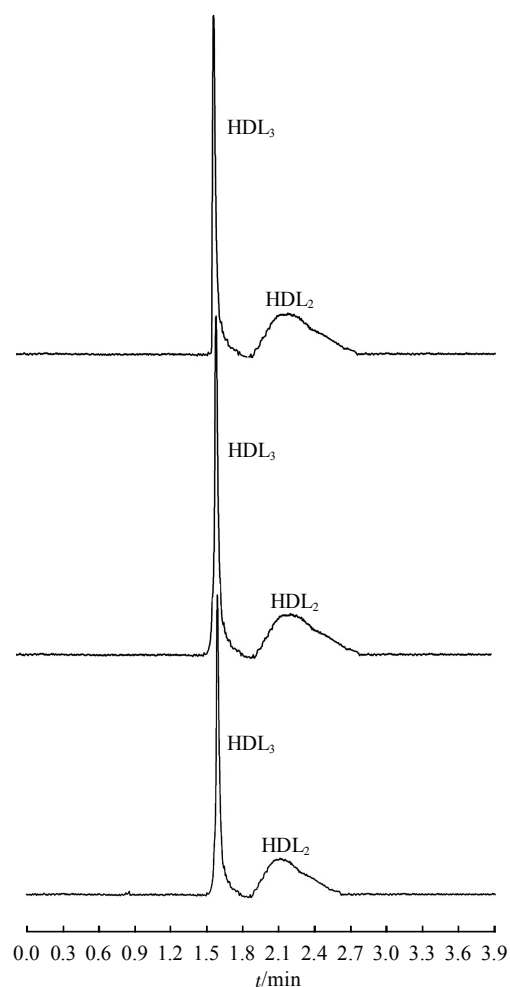


Fig. 5 Electropherograms of the healthy subject and its reproducibility

Separation conditions were the same as described in Figure 2.

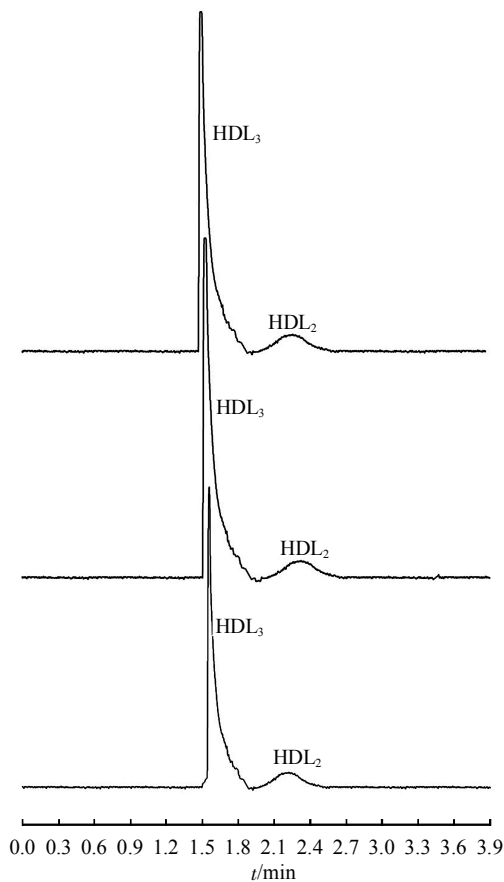


Fig. 6 Eletropherograms of the patient with CHD and its reproducibility

Separation conditions were the same as described in Figure 2.

2.4 CHD 患者与健康体检者 HDL 亚类的峰面积

表 2 为受试标本 HDL₂、HDL₃ 峰面积的统计学结果，可见 CHD 患者 HDL₂ ($P < 0.001$) 峰面积显著低于健康体检者组，CHD 患者 HDL₃ ($P < 0.001$) 峰面积显著高于健康体检者组，提示 CHD 患者 HDL₂ 有减少趋势，HDL₃ 有增多趋势。

Table 2 Peak area of serum HDL subclasses

	×1 000	
	CHD(<i>n</i> =18)	Healthy subject(<i>n</i> =23)
HDL ₂	0.285±0.039*	0.552±0.096
HDL ₃	1.394±0.091*	1.108±0.074

* Compared with control group, * $P < 0.01$.

3 讨 论

微流控芯片电泳可方便实现小体积(nl)进样、分离等操作，还可在分离时施加常规毛细管电泳难

以达到的高场强，能达到快速、高效分离。微流控芯片电泳用于血清脂蛋白的分离分析是由 Weiller 等^[11-12]于 2002 年首次报道的，本研究组前期也有过基于微流控芯片电泳技术，利用自制的微芯片结合 LIF 检测系统 3 min 内分离血清 HDL、低密度脂蛋白和极低密度脂蛋白^[9]的相关报道，重复性和稳定性均较好。

HDL 是由脂质(磷脂和游离胆固醇位于颗粒表面，胆固醇酯和三酰甘油位于核心)和蛋白质(载脂蛋白和多种少量其他蛋白质)组成的复杂大分子。HDL 不同亚类可以根据其密度、颗粒大小、电荷及组成不同进行分离，分析方法主要有超速离心法^[10]、梯度凝胶电泳法^[13]、质子核磁共振光谱法^[14]、免疫亲和层析法^[15]、双向电泳-免疫印迹法^[16]等，但这些方法多半费时耗力，技术要求高，无法在临床上推广应用。

本研究主要以微流控芯片电泳技术为平台，结合 LIF 检测系统，构建检测血清 HDL 亚类的方法。研究中首先优化了实验条件。Tricine、MEG 缓冲液具有较宽的 pH 范围，在电泳过程中能够保持稳定的电渗流，使结果具有良好的重复性。MEG 还具有动态涂层作用，能部分消除管壁对蛋白质的吸附。我们考察了 MEG 浓度对实验结果的影响，最后发现 MEG 浓度为 50 mmol/L，Tricine 浓度为 40 mmol/L 时，HDL 得到了最佳分离效果。脂蛋白颗粒在碱性溶液中带负电荷，电泳过程中，荷质比不同的脂蛋白组分在电渗流的驱动下实现分离，在极端 pH 时有利于电渗流，但同时极端 pH 易使蛋白质变性，影响检测结果。我们对缓冲液 pH 进行优化，分别考察了 pH 值为 7.8、8.0、8.2、8.5、8.8、9.2、9.8 时 HDL 亚类的分离效果。最后发现，pH 为 8.5 时，HDL 分离效率最高。蛋白质吸附会严重影响分离效率和重复性，SDS 是一种阴离子型表面活性剂，Ceriotti 等^[12]通过激光散射分析实验证实，样品溶液中存在低浓度的 SDS 时不会引起脂蛋白颗粒结构的改变，我们分别在样品缓冲液和分离缓冲液中添加了 0.2 mmol/L 和 0.01 mmol/L SDS，有效提高了分离效率和分离度。

实验中使用的沉淀剂按照中华医学会检验分会推荐的 PTA-Mg 沉淀法中描述配制，原理是利用沉淀剂中大分子多阴离子化合物(磷钨酸盐)与两价阳离子(镁离子)沉淀血清中乳糜微粒、低密度脂蛋白、极低密度脂蛋白和脂蛋白(a)，离心后上清液中只含有 HDL 一种脂蛋白。由表 1 可知，代表

HDL 的指标 HDL-C 和载脂蛋白 A1 在沉淀剂处理前后几乎不变, 而代表低密度脂蛋白、极低密度脂蛋白和脂蛋白(a)的另 3 个指标都近似 0, 由此断定离心后上清液中只含有 HDL 一种脂蛋白. 本实验中使用的荧光染料 NBD C₆-ceramide 是一种能与脂蛋白颗粒特异性结合的染料, 不受血清中其他物质干扰^[6].

图 5、图 6 分别为健康体检者和 CHD 患者血清 HDL 连续 3 次进样电泳图谱, HDL₃ 和 HDL₂ 峰均得到基线分离, 且重现性良好, 图 5、图 6 中 HDL₂ 峰的出峰时间和峰面积相对标准偏差分别为 2.76%、2.92% 和 2.85%、2.93%, HDL₃ 峰的出峰时间和峰面积相对标准偏差分别为 2.15%、2.24% 和 2.17%、2.31%. 表 2 为 18 例 CHD 患者血清标本和 23 例健康体检者血清标本的 HDL 亚类峰面积统计结果. 可见, CHD 患者 HDL₂ 显著降低 ($P < 0.01$), HDL₃ 显著升高 ($P < 0.01$), 可能是因为 CHD 患者逆向转运胆固醇的能力降低, 新生的 HDL₃ 较难转变为成熟的 HDL. 在后续实验中, 我们将进一步优化方法学, 并选择合适的内标, 争取快速简便完成定量测定.

综上所述, 本研究以微流控芯片电泳技术为平台, 结合 LIF 检测系统, HDL 亚类在 4 min 内达到高效分离, 重复性较佳, 测试费用低廉, 弥补了传统检测方法费时、繁琐等不足, 具有较大的推广价值.

参 考 文 献

- [1] Arnesjö B, Danielsson B, Ekman R, *et al.* Characterization of high density lipoproteins in human cholestasis. *Scand J Clin Lab Invest*, 1977, **37**(7): 587-597
- [2] Lin Y W, Huang M F, Chang H F. Nanomaterials and chip-based nanostructures for capillary electrophoretic separations of DNA. *Electrophoresis*, 2005, **26**(2): 320-330
- [3] Kato M, Gyoten Y, Sakai K K, *et al.* Rapid analysis of amino acids in Japanese green tea by microchip electrophoresis using plastic microchip and fluorescence detection. *J Chromatogr A*, 2003, **1013**(1-2): 183-189
- [4] Li Y, Buch J S, Rosenberger F, *et al.* Integration of isoelectric focusing with parallel sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis for multidimensional protein separations in a plastic microfluidic network. *Anal Chem*, 2004, **76**(3): 742-748
- [5] Munce N R, Li J Z, Herman P R, *et al.* Microfabricated system for parallel single cell capillary electrophoresis. *Anal Chem*, 2004, **76**(17): 4983-4989
- [6] Wang H, Wang H M, Jin Q H, *et al.* Microchip-based small, dense low-density lipoproteins assay for coronary heart disease risk assessment. *Electrophoresis*, 2008, **29**(9): 1932-1941
- [7] 叶应妩, 王毓三, 申子瑜. 全国临床检验操作规程(第 3 版). 南京: 东南大学出版社, 2006: 553-570
Ye Y F, Wang Y S, Shen Z Y. *National Guide to Clinical Laboratory Procedures*. 3rd. Nanjing: Southeast University Press, 2006: 553-570
- [8] Chen J F, Jin Q H, Zhao J L, *et al.* A signal process method for DNA segments separation in microchannel electrophoresis. *Biosens Bioelectron*, 2002, **17**: 619-623
- [9] Zhuang G S, Jin Q H, Liu J, *et al.* A low temperature bonding of quartz microfluidic chip for serum lipoproteins analysis. *Biomed Microdevices*, 2006, **8**(3): 255-261
- [10] Havel R J, Eder H A, Bragdon J H. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest*, 1995, **34**(9): 1345-1353
- [11] Weiller B H, Ceriotti L, Shibata T, *et al.* Analysis of lipoproteins by capillary zone electrophoresis in microfluidic devices: assay development and surface roughness measurements. *Anal Chem*, 2002, **74**(7): 1702-1711
- [12] Ceriotti L, Shibata T, Folmer B, *et al.* Low-density lipoprotein analysis in microchip capillary electrophoresis systems. *Electrophoresis*, 2002, **23**(20): 3615-3622
- [13] Blanche P J, Gong E L, Forte T M, *et al.* Characterization of human high-density lipoproteins by gradient gel electrophoresis. *Biochim Biophys Acta*, 1981, **665**(3): 408-419
- [14] Chung C P, Oeser A, Raggi P, *et al.* Lipoprotein subclasses and particle size determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy in systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol*, 2008, **27**(10): 1227-1233
- [15] Lee J Y, Lanningham F L, Boudyguina E Y, *et al.* Prebeta high density lipoprotein has two metabolic fates in human apolipoprotein A-I transgenic mice. *J Lipid Res*, 2004, **45** (4): 716-728
- [16] Tian L, Wu J, Fu M, *et al.* Relationship between apolipoprotein C-III concentrations and high-density lipoprotein subclass distribution. *Metabolism*, 2009, **58**(5): 668-674

Analysis of Serum High Density Lipoprotein Subclasses by Electrophoresis on Microfluidic Chip*

ZHENG Hui-Fei^{1,2)}, CONG Hui¹⁾, WANG Hui-Min^{1)**}, JIN Qing-Hui^{2)**}, ZHAO Jian-Long²⁾

¹⁾ Laboratory Medicine Center, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, China;

²⁾ Shanghai Institute of Microsystem and Information Technology, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200050, China)

Abstract A method that could separate the subclasses of high density lipoprotein (HDL) rapidly by microfluidic chip electrophoresis was reported. Combined with laser induced fluorescence detection system, using the microfluidic chip designed independent, using 40 mmol/L Tricine, 50 mmol/L MEG and 0.2 mmol/L SDS (pH 8.5) as sample buffer solutions, using 40 mmol/L Tricine, 50 mmol/L MEG and 0.01 mmol/L SDS (pH 8.5) as separation buffer solutions, the two subclasses, HDL₃ and HDL₂ could be separated in 4 min. HDL subclasses could be separated with high efficiency and good reproducibility. The operation was easy and cost little. This method could meet the demand of the clinical examination of HDL subclasses, with good clinical value.

Key words microfluidic chip electrophoresis, high density lipoprotein, analysis

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00506

*This work was supported by grants from Hi-Tech Research and Development Program of China (2007AA042106), National Basic Research Program of China (2007CB714502, 2007CB936000), Ministry of Health (2009ZX10004-301, 2009ZX10004-505), Key Subject of Jiangsu Province (XK200723), Society Development Foundation of Nantong (S8919, S2009012) and Science and Technology Commission of Shanghai Municipality (08110700200, 0752nm021).

**Corresponding author.

WANG Hui-Min. Tel/Fax: 86-513-85052102, E-mail: ntfyjk@pub.nt.jsinfo.net

JIN Qing-Hui. Tel: 86-21-62511070-8703, E-mail: jinqh@mail.sim.ac.cn

Received: August 25, 2009 Accepted: December 8, 2009