

# 凝胶基蛋白质芯片制备系统设计

张力<sup>1</sup> 段秉亚<sup>2</sup> 秦功伟<sup>1</sup> 仓怀兴<sup>2</sup>

(1. 陕西理工学院, 陕西汉中 723000; 2. 中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

**[摘要]** 设计构建了具有紫外实时检测功能的凝胶基蛋白质芯片制备系统, 借助毛细管电泳技术制备出凝胶基蛋白质阵列。芯片制备系统包括高压电源、毛细管电泳、点样阵列化和紫外定量检测4个功能模块, 其中高压电源具备可调输出功能, 毛细管电泳加装了超声波振动除气泡机构, 点样阵列化模块采用微米级三维位移台, 紫外定量检测模块使用了280nm单色LED。通过调节电泳电压、蛋白质浓度、毛细管直径以及点样停留时间等参数, 可以实现对样点大小和蛋白质含量的调节。

**[关键词]** 蛋白质芯片; 毛细管电泳; 紫外检测; 凝胶基板; 蛋白质微阵列

中图分类号: R318 文献标识码: A 文章编号: 2095-5200 (2015) 01-001-04

DOI: 10.11876/mimt201501001

**Design of the system for gel-based protein chip building** ZHANG Li<sup>1</sup>, DUAN Bing-Ya<sup>2</sup>, QIN Gong-Wei<sup>1</sup>, CANG Huai-Xing<sup>2</sup>. (1. Shaanxi University of Technology, Hanzhong 723000, China; 2. Institute of Biophysics, CAS, Beijing 100101, China)

**[Abstract]** A system for building gel-based protein chip with the function of ultraviolet real-time detection was designed and constructed successfully. The gel-based protein microarray was fabricated using the system with the aid of capillary electrophoresis technology. The system includes four modules: power supply of high voltage, capillary electrophoresis, protein sample dotting, ultraviolet quantitative detection. The outlet voltage of the power supply of high voltage module could be adjusted. The capillary electrophoresis module is equipped with ultrasonic vibration device for removing micro bubbles. The protein sample dotting module adopts the three dimensional stage of mm precision. The ultraviolet quantitative detection module uses the LED of 280nm. The sample dot size and protein content could be modulated through changing electrophoresis voltage, protein concentration, capillary diameter and electrophoretic time.

**[Key words]** Protein chip; Capillary electrophoresis; Ultraviolet detection; Gel-base; Protein microarray

## 引言

蛋白质芯片是指固定于支持介质上的蛋白质构成的微阵列, 又称蛋白质微阵列, 最早是在生物功能基因组学研究中继基因芯片之后, 作为基因芯片功能的补充发展起来的<sup>[1-2]</sup>。随着人类基因组计划(HGP)的顺利完成及后基因组时代的到来, 蛋白质组学研究已经成为生命科学研究的一个重要领域, 期间人们对蛋白质芯片这种快速、高通量、高灵敏度的蛋白质组学研究新技术的需求越来越强烈<sup>[3-4]</sup>。此外, 蛋白质芯片也与基因芯片一起, 正在逐步成为疾病诊断的重要手段<sup>[5-6]</sup>。

构建蛋白质芯片的基础是将特异性的蛋白质分子(如抗体分子)固定到基板并保持其活性<sup>[7]</sup>。由于蛋白质分子的复杂性, 蛋白质芯片制备进入低谷, 而

DNA芯片产业化则方兴未艾。制备蛋白质芯片最大的困难是如何保持蛋白质分子的活性, 其中最基本要素是水环境, 作为生物活性分子, 蛋白质离开水就会失去活性<sup>[8,9]</sup>。因此蛋白质的固定策略非常重要, 如何在不同的固相表面固定足够多的保持生物活性的蛋白质分子是具有挑战性的工作。当前蛋白质芯片多采用玻璃基板表面修饰固定蛋白质, 或者是阵列微孔吸附蛋白质。这些方法不仅制备工艺复杂, 而且蛋白质分子很容易失水变性, 从而导致芯片失效。

本文基于“十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺”(SDS-PAGE)非变性凝胶和毛细管电泳(CE)技术, 设计蛋白质芯片制备系统, 一方面为蛋白质分子保持活性提供了缓冲液环境, 另一方面实现了系统的微量和高效点样, 不失为一种低成本和简单可靠的蛋白质

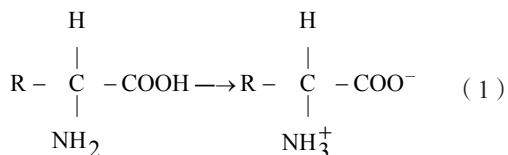
基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 91023004)。

通讯作者: 仓怀兴, 博士, 中国科学院生物物理研究所研究员, 研究方向: 生物仪器技术, hxcang@ibp.ac.cn。

芯片制备系统。

### 1 原理

构成蛋白质的氨基酸是两性电解质，如式(1)所示。因此蛋白质也是两性电解质，其分子表面带有电荷，因而在电场作用下可以在溶液中泳动。



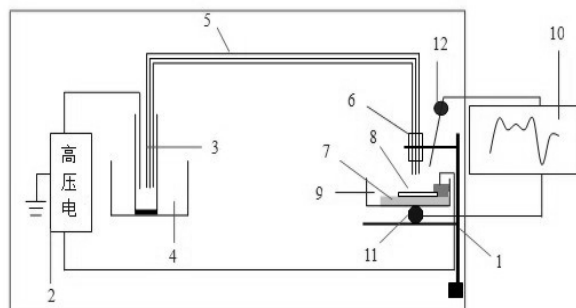
聚丙烯酰胺、琼脂糖等凝胶为富含水分的多孔介质，物理化学稳定性好，被广泛用作蛋白质等生物活性物质的电泳或层析法制备时的载体，疫苗、胰岛素等生物制剂的生产也离不开凝胶技术。

SDS-PAGE 非变性凝胶含有大量水分且 pH 可调，有利于蛋白质的活性保持，凝胶的分子筛效应便于固定蛋白质，又具有导电性，此外还具有成本低廉、厚度可调、便于切割等优点。

为了快速分离和分析微量生物样品，毛细管电泳应运而生。毛细管电泳常用毛细管内径为 75μm 和 50μm，工作时施加数十千伏高压，可以获得高于 40 万理论塔板数的分离柱效<sup>[10]</sup>。借助毛细管微量和高效特点，可以将蛋白质通过电泳的方法定量转移到芯片基板的非变性凝胶中。

### 2 系统设计

要完成蛋白质微量快速的阵列化点样和蛋白质活性的长期保持，蛋白质芯片制备系统须包括高压直流电源模块、蛋白质毛细管转移模块(电泳模块)、蛋白质定量检测模块和点样阵列化模块。整个系统结构原理如图 1 所示，其中步进电机 1 代表点样阵列化模块，高压电 2 代表电源模块，3-9 和 11 构成电泳模块，10-12 构成检测模块。



1- 步进电机, 2- 高压直流电源, 3- 样品池, 4- 超声波振荡器, 5- 毛细管, 6- 点样笔, 7- 基板夹, 8- 凝胶基板, 9- 缓冲液池, 10- 紫外检测模块, 11- 光电倍增管, 12- 紫外光源

图 1 蛋白质芯片制备系统构成原理图

### 2.1 高压直流电源模块

毛细管电泳所需要的电压为 0 ~ 30kV 的直流高压电源，电流为 100 ~ 500mA，电压输出精度要求高于 1%，电压和电流稳定性要求变化不高于 0.02%。

经查询，陕西咸阳威思曼生产高质量的电泳用高压电源，其中 ME15P15 型高压电源可提供 0-15KV 的高压，但其需要 24V ± 10% 的直流电源作为它的上一级电源(最大电流为 4.25A)。24V 直流电源使用 220V 交流电源，选用普通直流开关电源即可。

根据实际需求，不同蛋白质对电泳高压电源的电压和电流的要求会有所不同，所以需要调压电位器调节以获得需要的输出电压。ME15P15 型高压电源自有电位器接口，需选购相应接口的电位器进行安装。

电源接线：由于毛细管电泳电源电压为万伏级，安全起见采取了将电源的输入接地端口与 24V 直流电源的接地端用导线共连、负载回路接地、高压电源的输出端和相应的负载相接通、负载的另一端接地等防护措施，接线如图 2 所示。

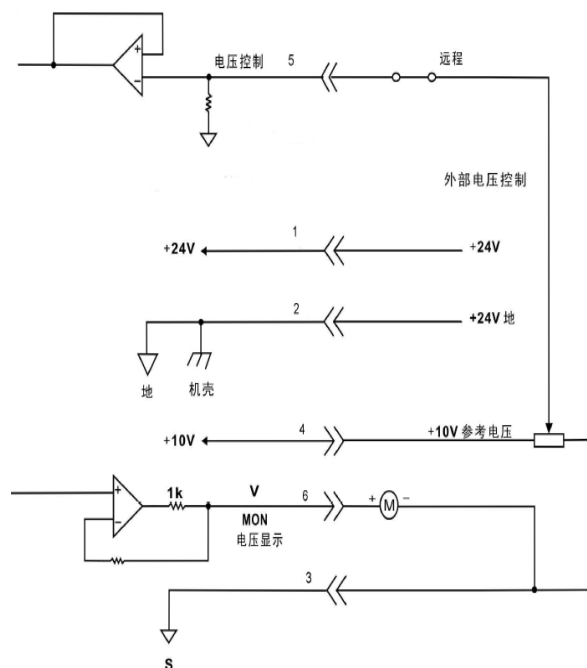


图 2 电源模块接线线路图

24V 直流电源安装：AC-L 是交流火线输入，AC-N 是交流零线端口，FG 为接地端口，G 为直流输出的接地端，V 为电压输出端口。

20KW 电位器的安装：高压电源的输出电压没有自动调节器，需要采接电位器的方法来实现调节高压大小的目的。根据高压电源说明书，选取 20KW 的电位器，按图 3 所示接线。将电位器的可调节端接入到 KV-PROG IN，表明输入电路的电压大小。将电位器表盘旋转使得示数为零，用万用表分别测量可变动端

和其它两根接线之间的电压，测得电压几乎为零的一端接入 +10V 的接口；测得电压接近 20K 的一端接入 GND 接口。接好之后就可以调节电位器的旋钮，来改变分压电路中接入电阻的数值，进而改变高压电源输出电路的电压。

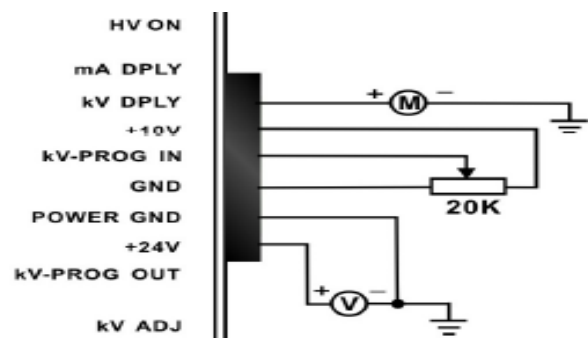


图3 电位器与高压电源连接线路图

### 2.2 蛋白质毛细管转移（电泳）模块

包括蛋白质样品池、毛细管、凝胶基板、基板夹、缓冲液池等（见图1），毛细管中充满蛋白质溶液并通过两端连通样品池和凝胶。电泳模块功能是借助高压电场将样品池中的蛋白液通过毛细管转移到凝胶基板中。但是由于凝胶基板易于失去水分干燥卷曲，需要将其置于缓冲液中。为了给凝胶加电，特制了专用电极。

### 2.3 定量检测模块

为了保证每个样品阵点处样品量的一致性，需要检测样品点处蛋白质浓度，采用紫外吸收技术路线。模块包括 280nm 紫外光源、滤镜、光电倍增管（PMT）、数字式微安表等。图4是检测模块的结构示意图，280nm 的紫外光聚焦穿过石英基板上凝胶中的样点，光电倍增管对经过滤镜过滤的 280nm 单波长光进行光电转换，用数字式微安表对转换的电流进行扫描，即可确定电流与样点蛋白质浓度之间的对应关系。此外，C型支架结构可以使点样-紫外检测联动，以保证检测数据的准确性和可重复性。

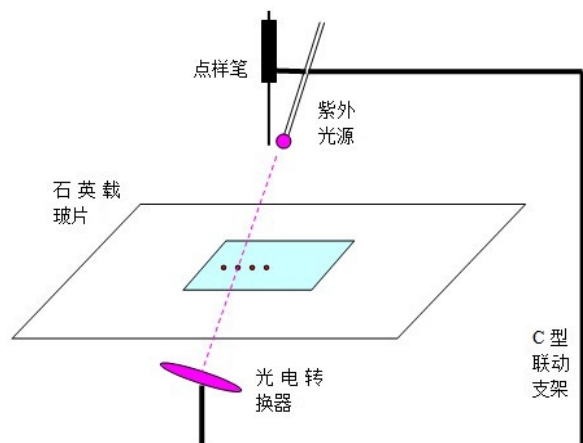
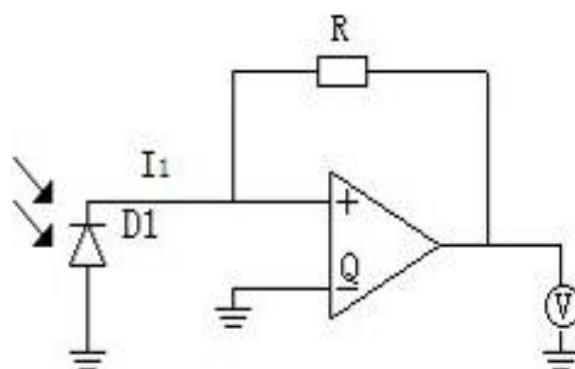


图4 检测器设计图

信号放大器的设计：由于紫外 LED 灯的功率仅有 0.5mW，光电转换器接收到的能量很小，为了测量数值的有效性和控制更少的蛋白消耗，实验中设计并安装了 1000 万倍的放大电路。放大电路设计如图 5 所示。



(a) 原理图



(b) 实物图

图5 放大电路

### 2.4 点样阵列化模块

包括电源、三维位移台、点样笔及机械臂等部件。可以设计专用夹具夹持毛细管，一个简单替代措施是使用铅笔芯为 0.3mm 的自动铅笔作为毛细管点样端的夹持件，并通过机械臂固定在位移台 Z 轴滑台上，借助位移台 Z 方向上下运动实现抬笔落笔。位移台的 XY 运动用于带动凝胶基板的移动，实现阵列化样点。

采购北京微纳光科公司的 WNMC 400 型三维位移台，最小步长达微米级。

## 3 系统集成测试

以上 4 个模块构建完毕后，按图 1 所示结构关系连接在一起，高压电源的正极和电泳毛细管进样端插入到样品池中，毛细管出样端经活动铅笔与凝胶基

板连通,使用电位器调节高压电源的输出电压。

该系统的关键环节是毛细管电泳,在加电测试前要检查确认毛细管是否充满液体。检查方法是使用万用表测试毛细管两端电阻,电阻值小于 $100\Omega$ 即为导通。

测试用蛋白质为鸡蛋清溶菌酶,0.1M 乙酸-乙酸钠缓冲液, pH4.5。

基本操作步骤是:

- (1) 用平针头注射器将蛋白液注入毛细管;
- (2) 将毛细管两端和高压电源两极分别接入样品池和缓冲液池;
- (3) 启动三维位移台将毛细管出液口插入凝胶100mm 深;
- (4) 开通电泳高压,持续数秒后断开(也可根据紫外检测数据控制);
- (5) 操作位移台抬起毛细管并移动到另一个阵点位置;
- (6) 重复步骤(3)、(4)、(5),直至点样结束。

测试试验时发现,系统经常出现只能点出一个样点的问题。经认真分析排查,确定两个主要原因:一是所加电压过高使得液体在毛细管出口处电解出微小气泡,气泡聚集隔断了电泳通道和电路的导通;二是在第一个阵点停留时间较长,毛细管中的蛋白质消耗殆尽。

针对以上问题,我们一方面加大蛋白液用量,另一方面在缓冲液池外加装超声波振荡器以及及时清除电解产生的微小气泡。

以上措施成功解决了系统存在的问题,图6是系统点出的蛋白质阵点,为便于观察,蛋白被染色(考马斯亮蓝 G250)。

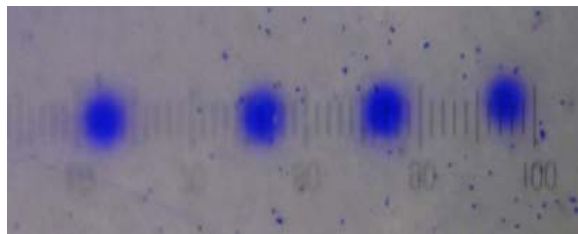


图6 凝胶基板中的蛋白质阵点(标尺每小格为0.1mm)

## 4 讨论

试验发现高压电压、点样停留时间、蛋白质浓度、凝胶浓度以及毛细管出液口形状等都会对点样质量产生影响。电压越高、点样停留时间越长、蛋白质浓度越大,阵点的尺寸也越大。凝胶浓度对阵点影响较小,增大凝胶浓度使阵点尺寸稍有下降。

需要说明的是,虽然系统测试结果达到预期目的,但仍存在一些问题,如测试时三维位移台由人工操作,点样时间会有误差,尤其是小于1秒的操作误差较大;280nm 单波长 LED 在较长时间工作后会发热而不稳定,环境光线变化引起检测系统不稳定等。这些问题的解决将有效地促进蛋白质芯片制备技术的实用化和产业化。

## 参 考 文 献

- [1] Lee Y-S, Mrksich M. Protein chips: from concept to practice[J]. Trends in Biotechnology, 2002, 20(12 Suppl): 14-18.
- [2] 张浩,李晓霞,张军权,等. 蛋白质芯片的研究进展[J]. 微生物学免疫学进展, 2001, 29(4): 69-72.
- [3] Zhou HH, Roy S, Schulman H, Natan MJ. Solution and chip arrays in protein profiling[J]. Trends in Biotechnology, 2001, 19(10 Suppl): 34-39.
- [4] 张丰德,王秀玲. 现在生物学技术(第二版)[M]. 天津:南开大学出版社, 2001.
- [5] 张军伟. 应用蛋白质芯片技术在人血清中发现肾癌差异蛋白的研究[D]. 乌鲁木齐:新疆医科大学, 2012.
- [6] Sauer U, Domnanich P, Preininger C. Protein chip for the parallel quantification of high and low abundant biomarkers for sepsis[J]. Analytical Biochemistry, 2011, 419: 46-52.
- [7] 刘子一,石霖. 常规蛋白质芯片的构建方法及前景[J]. 现代畜牧兽医, 2011, 4: 63-66.
- [8] Kusnezow W, Hoheisel JD. Antibody microarrays: promises and problems[J]. Biotechniques, 2002, 33(Suppl): 14-23.
- [9] 杨小丽. 新型体外诊断用蛋白质芯片基底材料以及表面化学策略[D]. 上海:第二军医大学, 2010.
- [10] Lukacs KD, Jorgenson JW. Capillary zone electrophoresis: Effect of physical parameters on separation efficiency and quantification[J]. Analytical Chemistry, 1985, 8(8): 407-411.