

条形码微流控芯片在分泌蛋白检测方面的应用

乔栋娟, 蔡继业*

暨南大学生命科学技术学院化学系, 广州 510632

摘 要: 微流控芯片具有液体流动可控、消耗试样少、分析速度快等特点, 它可以在几分钟甚至更短的时间内进行上百个样品的同时分析, 并且可以实现在线样品的预处理及分析全过程。一种条形码微流控芯片能够以高密度的单链 DNA 为模板, 从而克服了传统蛋白质微流控芯片固定在固体表面容易变性的缺点, 既解决了稳定性的要求, 又满足芯片平行处理大量数据的要求, 可以用来大量的、快速的定量检测细胞的分泌蛋白。条形码微流控芯片因其对样品要求简单、低耗高效、高通量等特点正在成为分泌蛋白检测的最具吸引力的分析工具, 在样品分析与检测以及临床检测研究等领域得到了广泛的应用。

关键词: 微流控芯片; 分泌蛋白; 聚二甲基硅氧烷

DOI:10.3969/j.issn.2095-2341.2012.05.03

Applications of Barcode Microfluidic Technology in Detecting Secreted Proteins

Qiao Dong-juan, Cai Ji-ye*

College of Life Sciences and Technology, Jinan University, Guangzhou 510632, China

Abstract: Microfluidic chips have the features of controllable liquid flow, less sample and reagents consumption, faster analysis speed. It can be used to analyze hundreds of samples in a few minutes or even shorter time, and be sued to realize the sample online pretreatment and analyze the whole process. This paper introduced a barcode microfluidic chip, which with the peculiarity of high density of ssDNA as templates. Traditional protein microfluidic chip had the shortcoming of denaturing easily once fixed on the solid surface. Barcode microfluidic chip not only solved the requirement of stability but also met the requirement of handling large amounts of data. It can be used to detecte lots of cell secretory protein fast. Barcode microfluidic chip is becoming the most attractive analysis tools of detecting secreted proteins, because of its characteristics of simple sample preparation, low consumption and high efficiency and high flux, which has been widely used in the fields of analyzing and detecting sample and clinical research.

Key words: microfluidicss; secreted proteins; PDMS

微流控芯片系统是最新发展起来的一种以微电机加工技术为基础构建的微型全分析系统, 将生物和化学领域中涉及的样品制备、分离、检测等操作最大限度的转移到微分析设备中, 甚至是几厘米的芯片上, 使得仪器的体积微型化、功能集成化、分析快速化。

微流控芯片包括 DNA 芯片^[1] 和蛋白质芯片^[2], 通常蛋白质芯片所用的检测系统是蛋白质

(一般为抗体)。抗体不仅有很好的特异性, 而且目前通过抗体工程已经得到了数量极为可观的抗体库, 因此, 这些抗体制造的蛋白质芯片, 由于能够特异性的捕获功能蛋白并对其进行分析而受到众多研究者的青睐。已有商业化的抗体阵列芯片被用来捕获病原体或者特殊蛋白质, 如细胞因子等^[3~6]。但是将蛋白质(一般为抗体)固定在微流控芯片上又使其保持活性是比较困难的。所以

收稿日期:2012-08-25; 接受日期:2012-09-14

基金项目:国家 973 计划项目(2010CB833603)资助。

作者简介:乔栋娟, 硕士, 主要从事生物纳米技术研究 T 细胞的抗原识别和活化。E-mail: qiaodongjuan@126.com。* 通讯作者: 蔡继业, 教授, 主要从事抗体-抗原分子识别的结构基础和功能研究。Tel:020-85223569; E-mail: tjycail@jnu.edu.cn

本文介绍一种条形码微流控芯片技术,它可将目标物质转向性质稳定的 DNA 寡聚物,用其代替蛋白质固定在微流控芯片上,然后通过识别并捕获与其互补的单链 DNA 和相应蛋白质组成的聚合物形成蛋白质捕获探针,通过捕获靶蛋白来完成对不同分泌蛋白的检测和分析。DNA 芯片的优点在于性质稳定和密度高,有权威人士估计,DNA 芯片的空间分辨率可达到微米水平。蛋白质芯片的优点在于通过数量可观的抗体作为探针可对各种功能蛋白进行全面的分析。条形码微流控芯片结合了两者的优点,不仅解决了稳定性的要求,而且可以满足芯片平行处理大量数据、多功能检测的要求。

传统的分泌蛋白检测方法有酶联免疫吸附测定法和流式细胞术^[7]。酶联免疫吸附测定法在单细胞水平上只能同时检测 1~3 种细胞分泌蛋白,流式细胞术也最多可以检测 5 种细胞分泌蛋白。目前随着实验技术复杂性的增加,5 种分泌蛋白同时检测已经不能满足要求,很多时候我们需要大量的不同种类分泌蛋白同时检测。而条形码微流控芯片可以同时快速检测大量的分泌蛋白,尤其是用于检测细胞因子。细胞因子是免疫细胞的产生的一大类能在细胞间传递信息、具有免疫调节和效应功能的蛋白质或小分子多肽,通过检测细胞因子我们可以确定细胞的功能指标。

条形码微流控芯片对测试环境的要求较低^[8],对实验操作者技术要求少,操作简单。条形码微流控芯片最突出的优点是实现了实时在线检测,减少了样品在运输和存储过程中的损失。目前条形码微流控芯片正在向与其他仪器的联合使用及实现自动化的方向发展,有望在组织和病理学领域得到应用,有着广阔的应用前景。

1 条形码微流控芯片的制作

条形码微流控芯片由两层网格状的聚二甲基硅氧烷(PDMS)组成^[9],包括控制层和流动层,其中流动层和控制层的图案是根据实验所需要的模型通过光刻技术制成,然后将控制层小心的放置在流动层上,经过热处理等操作使二者粘合在一起。实验所用的微流控平台是首先将 ssDNA 溶

液流入流动层形成条形码并印刷到含有聚胺的基片上,与传统的芯片相比最小化了 DNA 和抗体的用量,而且分析速度快^[10,11]。条形码微流控芯片的制作过程如图 1 所示(彩图见封三图版)。

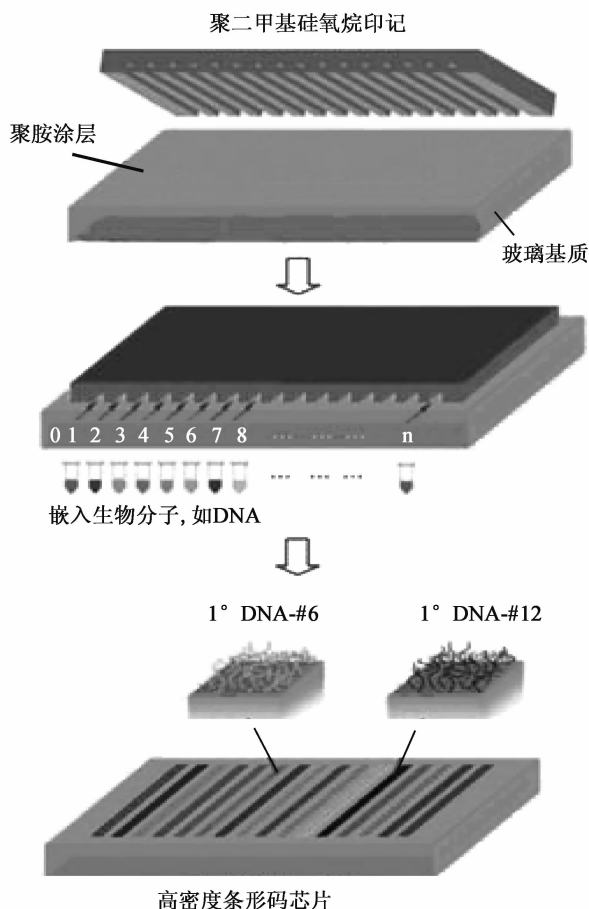


图 1 条形码芯片的制作过程^[12]

Fig. 1 Depiction of the procedure of bar code microfluidic chips^[12].

(彩图见封三图版)

2 条形码微流控芯片的检测原理

条形码微流控芯片采用的是 DNA 编码抗体库的方法(DEAL),以单链的 DNA 作为模板,用来捕获由与其互补的单链 DNA 和相应蛋白质组成的复合物,以此复合物来特异性的捕获靶蛋白。靶蛋白特异性的捕获生物素化的检测抗体,进一步通过链霉亲和素连接的荧光染料作为识别信号检测到相应分泌蛋白,通过对荧光信号的种类和强度的分析,进而实现不同种类分泌蛋白的检测和分析(图 2,彩图见封三图版)^[12]。

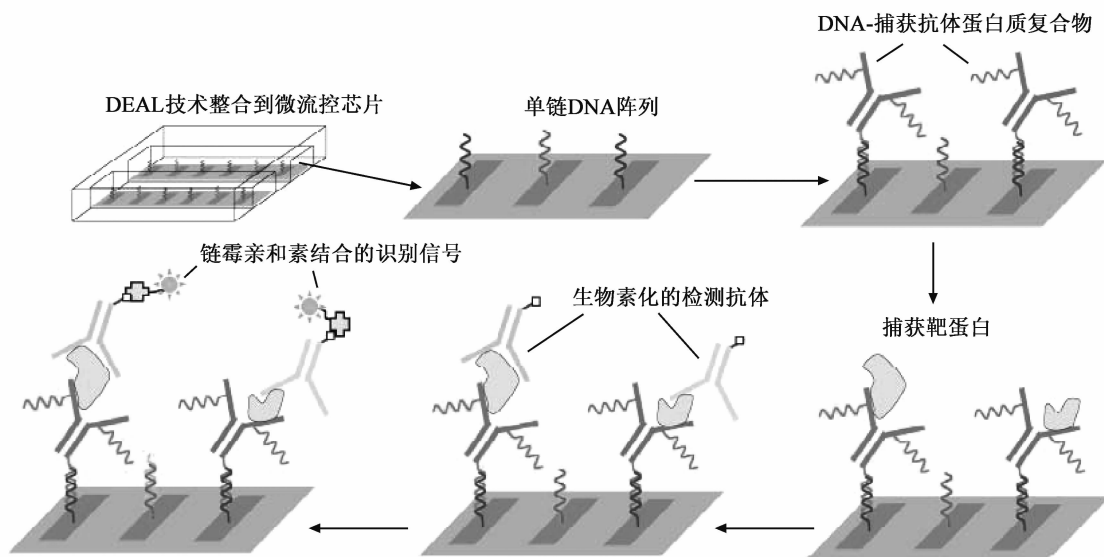


图 2 DNA 编码抗体库的方法多参数的检测分泌蛋白的原理图^[12]

Fig. 2 Schematic depiction of multiparameter detection of proteins in integrated microfluidics using the DNA-encoded antibody library (DEAL) technique^[12].

(彩图见封三图版)

3 条形码微流控芯片的应用

3.1 条形码微流控芯片在细胞分泌蛋白检测方面的应用

条形码微流控芯片的流动层用来装载细胞和试剂,控制层则通过控制阀来控制进入芯片的样品和试剂,以及控制样品和试剂的流速和流动方向。整合的流动层和控制层将芯片分成1 000多个微室,细胞随机的进入微室,在每个微室中细胞的克隆和分泌都是相对独立的。每个微室中的细胞含量为1~10个,从形成了单细胞条形码芯片(SCBC)^[13]。其次在每个微室中 ssDNA 特异性的捕获与其互补的单链 DNA 和抗体组成的聚合物,抗体又能够特异性的捕获分泌蛋白。这些检测蛋白都是通过荧光染料进行标记的二抗进行检测,用激光照射在荧光显微镜下就可以看到每个微室的分泌蛋白的种类和相对含量的多少(图3,彩图见封三图版)。

Bailey 等^[14]在微流控芯片上,采用 DNA 编码抗体的方法研究了细胞的分类和分泌蛋白的检测,实验结果表明,微流控平台结合 DNA 编码抗体的方法可以成功地对细胞进行分类和分泌物的检测,有望用于复杂细胞的分类以及癌症组织等病理学的研究。

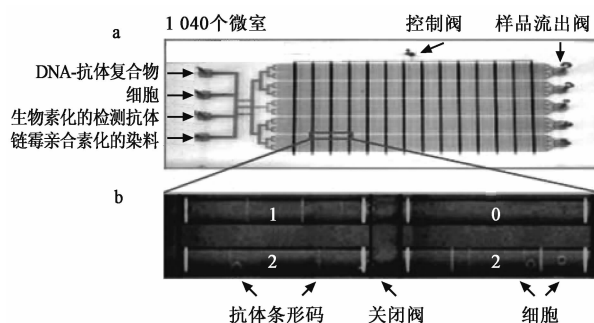


图 3 SCBC 的剖面图^[3]

Fig. 3 Profile of SCBC^[3].

a 图为 SCBC 的剖面图,其中红色为流动通道,蓝色为控制阀。
b 图为荧光显微镜下微室载入的细胞和每个独立微室的试剂条形码的光学图片。

(彩图见封三图版)

Fan 等^[12]利用条形码芯片快速的、多路复用的对微升级的血样进行了原地分析,实验所用芯片每个微室有12个条形码,分别对应要检测的12种细胞因子,每个微室可以容纳1~10个细胞,实现了单细胞的测定,同时有效地防止了血样在存贮过程中的退化,实验通过对血浆中细胞因子的检测,成功的将22位癌症病人的血浆分类,这22位病人中有11位是乳腺癌患者,另外11位是前列腺癌患者。实验结果表明,不同的病人由于病情的不同,分泌的细胞因子的种类和含量不

同,可根据此将病人进行分类,也证明条形码芯片可以用于与人类疾病有关的检测。

3.2 微流控芯片在临床方面的应用

Ma 等^[13]报道了一种临床微流控条形码芯片,用于在单细胞水平上评估表型相似的 T 细胞的功能异质性。该平台能够对单细胞的分泌蛋白(多于 10 种)进行定量检测,实验结果表明,表型相似的 T 细胞,由于分泌不同种类和数量的细胞因子而表现出很强的功能异质性。该平台代表了一种新的、有用的工具,可用于免疫监控和临床诊断。Zhu 等^[15]利用微流控装置检测了 T 细胞分泌的细胞因子,实验主要检测了 CD4 和 CD8 T 细胞分泌的白细胞介素(IL)-2 和干扰素(IFN)- γ ,实验所用的捕获探针是抗体微阵列。实验结果表明,这种微流控装置中的抗体微阵列能够特异性地捕获人全血中所需的 T 细胞并识别和定量 T 细胞分泌的(IL)-2 和(IFN)- γ 的浓度,并且有望作为免疫学工具对 T 细胞进行多参数分析,用于 HIV 和其他疾病的检测和诊断。Ahmad 等^[16]报道了一种以微流控为基础的、能自动化的制造高密度 DNA 微阵列的微流控平台,该微流控平台可成批的制造 DNA 条形码芯片,从而实现了多芯片同时分析和检测,用于单细胞分泌蛋白的检测。整个条形码印刷过程都是通过定制的软件控制自动完成的,使得检测的灵敏度更高,对实验者的技术要求降低。通过检测单个巨噬细胞分泌的一组蛋白,结果表明,该微流控平台具有重现性好、实用性高等特点。这样自动化的平台使得微流控条形码芯片的检测速度更快、灵敏度更高、应用更加广泛。Chi 等^[8]利用单细胞蛋白质组微芯片分析单个肿瘤细胞内的信号通路。实验评估了蛋白质-蛋白质间的相互作用与 P13K 信号通路的关系。实验证实 EGF 的刺激大大地加强了蛋白质-蛋白质间的相关性,从而也为通过抑制下游的信号进而抑制下游蛋白质的表达带来了困难,也给治疗带来了阻力。这个实验结果与临床上的治疗失败以及缺乏下游蛋白质表达的抑制剂是一致的,所以 SCBC 单细胞实验可以给临床治疗提供一定的参考意见。

4 展望

细胞并不是单独存在的,细胞与细胞之间通

过信号分子进行交流。分泌蛋白是细胞通讯的一种方式,在一定程度上能够反映细胞的微环境^[17~21]。细胞的微环境信息对于抗肿瘤的靶向治疗是非常关键的。所以微流控芯片可以为临床治疗带来帮助。条形码微流控芯片科学合理的利用多路复用技术,实现了小型化、灵敏度高、成本低、产量高。在生物医学领域它可以使珍贵的生物样品和试剂消耗降到微升甚至纳升级,在化学领域可以使以前需要的大实验室花大量样品和时间才能完成的分析和合成,在一块小芯片上快速的完成,而且微流控芯片由于排污少,被誉为绿色技术。微流控芯片的应用也更加广泛,实现了对多个病人进行多种疾病的检测和疾病早期诊断,在临床应用方面已经从单细胞蛋白组^[22,23]向复杂的组织工程发展^[24]。目前微流控芯片在应用上的进一步目标是将生物样品处理到纳米级。虽然目前微流控芯片仍然只是单独使用,如果将芯片与流式细胞仪等联合使用将会带来更大的方便。

参考文献

- [1] Rose D. Microfluidic technologies and instrumentation for printing DNA microarrays [A]. In: Schena M. (ed). Microarray Biochip Technology [M]. Eaton Publishing, 2008, 19-38.
- [2] Usui-Aoki K, Kyo M, Kawai M, *et al.*. Protein and antibody microarrays: clues towards biomarker discovery [J]. *Frontiers Drug Design & Discovery*, 2006, 2: 23-33.
- [3] Delehanty J B, Ligler F S. A micro array immunoassay for simultaneous detection of proteins and bacteria [J]. *Anal. Chem.*, 2002, 74(21):5681-5687.
- [4] Falsey J R, Reni L M, Park S, *et al.*. Peptide and small molecule microarray for high throughput cell adhesion and functional assays [J]. *Bioconj. Chem.*, 2001, 12(3): 346-353.
- [5] Li Y W, Reichert W M. Adapting cDNA microarray format to cytokine detection protein arrays [J]. *Langmuir*, 2003, 19(5): 1557-1566.
- [6] Wang C C, Huang R P, Sommer M, *et al.*. Array-based multiplexed screening and quantitation of human cytokines and chemokines [J]. *J. Proteome Res.*, 2002, 1(4):337-343.
- [7] Seder R A, Darrah P A, Roederer M. T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design [J]. *Nat. Rev. Immunol.*, 2008, 8: 247-258.
- [8] Chi Q H, Ain L D, Wei W, *et al.*. Single-cell proteomic chip for profiling intracellular signaling pathways in single tumor cells [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2012, 109(2): 419-424.
- [9] Thorsen T, Maerki S J, Quake S R. Microfluidic large-scale

- integration[J]. *Science*, 2002, 298(5593): 580–584.
- [10] Kane R S, Takayama S, Ostuni E, *et al.*. Patterning proteins and cells using soft lithography[J]. *Biomaterials*, 1999, 20(23–24):2363–2376.
- [11] Hwang H, Kang G, Yeon J H, *et al.*. Direct rapid prototyping of PDMS from a photomask film for micropatterning of biomolecules and cells[J]. *Lab Chip*, 2009, 9(1): 167–170.
- [12] Fan R, Vermesh O, Srivastava A, *et al.*. Integrated barcode chips for rapid, multiplexed analysis of proteins in microliter quantities of blood[J]. *Nat. Biotechnology*, 2008, 26:1373–1378.
- [13] Ma C, Fan R, Ahmad H, *et al.*. A clinical microchip for evaluation of single immune cells reveals high functional heterogeneity in phenotypically similar T cells[J]. *Nat. Med.*, 2011, 17(6):738–743.
- [14] Bailey R C, Kwong G A, Radu C G, *et al.*. DNA-encoded antibody libraries: a unified platform for multiplexed cell sorting and detection of gens and proteins[J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, 129(7):1959–1967.
- [15] Zhu H, Stybayeva G, Macal M, *et al.*. A microdevice for multiplexed detection of T-cell-secreted cytokines[J]. *Lab Chip*, 2008, 8(12):2197–2205.
- [16] Ahmad H, Sutherland A S. A robotics platform for automated batch fabrication of high density, microfluidics based DNA microarrays, with applications to single cell, multiplex assays of secreted proteins [J]. *Rev. Sci. Instrum.*, 2011, 82(9): 094301.
- [17] Hanahan D, Weinberg R A. Hallmarks of cancer; the next generation[J]. *Cell*, 2011, 144(5): 646–674.
- [18] Weinberg R A. Coevolution in the tumor microenvironment [J]. *Nat. Genet.*, 2008, 40: 494–495.
- [19] Anderson A R, Weaver A M, Cummings P T, *et al.*. Tumor morphology and phenotypic evolution driven by selective pressure from the microenvironment[J]. *Cell*, 2006, 127(5): 905–915.
- [20] Tlsty T D, Coussens L M. Tumor stroma and regulation of cancer development[J]. *Annu. Rev. Pathol.*, 2006, 1: 119–150.
- [21] Polyak K, Haviv I, Campbell I G. Co-evolution of tumor cells and their microenvironment [J]. *Trends Genet.*, 2009, 25(1): 30–38.
- [22] Shin Y S, Ahmad H, Shi Q, *et al.*. Chemistries for patterning robust DNA microbarcodes enable multiplex assays of cytoplasm proteins from single cancer cells[J]. *Chemphyschem*, 2010, 11(14): 3063–3069.
- [23] Shi Q H, Qin L D, Wei W, *et al.*. Single-cell proteomic chip for profiling intracellular signaling pathways in single tumor cells[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2012, 109(2):419–424.
- [24] Vermesh U, Vermesh O, Wang J, *et al.*. High-density, multiplexed patterning of cells at single-cell resolution for tissue engineering and other applications[J]. *Angew. Chem.*, 2011, 50(32):7378–7380.