

# 微流控芯片与生物质谱联用技术的发展与展望

水雯箐, 苏 佳, 黄珍玉, 黄 懿, 杨芃原\*

(复旦大学化学系, 上海 200433)



[作者简介]: 水雯箐, 女(汉族), 生于 1980 年 5 月 26 日, 上海人。2001 年毕业于复旦大学化学系, 在读硕士研究生, 分析化学专业, 现为复旦化学系分析化学专业一年级硕士研究生, 主要研究对象是制作研究用于蛋白、肽段等生物样品分离分析的微流控芯片, 并利用微流控芯片生物质谱联用进行检测。

摘要: 本文系统归纳了当前微流控电泳芯片与生物质谱的联用模式。芯片材质涵盖玻璃与高聚物, 与接口衔接的电离手段包括电喷雾电离(ESI)和基质辅助激光解析电离(MALDI)。此两种技术的联用推动了蛋白质组学等生化研究领域的新技术平台的发展。

关键词: 微流控芯片; 微芯片; 生物质谱; 发展和展望

中图分类号: O 657. 63; O 859 文献标识码: A 文章编号: 1004-2997(2002)02-0100-08

随着微流控分析系统从分离检测发展为包括复杂前处理的高功能全分析系统, 其相应检测器的种类和形式不断趋于多样化。生物质谱(BioMS)作为现代生化分析的重要技术, 因其能够提供试样组分中生物大分子的基本结构和定量信息, 在微全分析领域已显示出作为芯片检出器的巨大潜力。

20 世纪 90 年代, 质谱仪器及相关技术的改进使蛋白质化学发生了革命性的变化, 而促成这一转变的关键因素就是 80 年代末两项“软电离”技术的突破性进展: 电喷雾电离(ESI)和基质辅助激光解析电离(MALDI)。其“软”性能够在特定条件下保持生物大分子的非共价相互作用, 这对蛋白和多肽的组成和功能分析极为重要。

ESI/MS 在过去十多年的迅猛发展, 主要归因于其液体进样方式可与高效分离技术如 HPLC 和毛细管电泳方便联用, 为微流控芯片与质谱联用提供了必要条件。常规 ESI 技术的主要问题就是试样消耗量大(近 mL 级)、分析灵敏度低, 而实际的生化耗样量通常不超过  $\mu\text{L}$  级。微电喷雾( $\mu\text{-ESI}$ )的提出使试样消耗量维持在  $\mu\text{L}/\text{min}$ , ESI 喷针内径仅 10~15  $\mu\text{m}$ ; 即使这样仍不适应许多生物分析耗样极低的要求。90 年代中期, 纳电喷雾(n-ESI)应运而生<sup>[1]</sup>, 其喷口内径在 10  $\mu\text{m}$  以下, 溶液消耗量可降至几十至几百  $\text{nL}/\text{min}$ 。  $\mu\text{-ESI}$  和 n-ESI 技术的成熟最终使基于毛细管电泳或色谱的芯片分离技术与生物质谱的连接浑然天成。作者所在研究组已报道的脉冲电喷雾<sup>[2]</sup>技术可使常规 ESI 在  $\mu\text{-ESI}$

收稿日期: 2002-04-18

作者简介: 水雯箐(1980~), 女(汉族), 上海市人, 硕士研究生, 分析化学专业

\*: 通讯联系人



状态工作, 而溶液的消耗仅在 n-ESI 范围。此外, 微流控芯片与生物质谱的另一电离技术 MALDI 的联用也已初步实现。

Karger 等<sup>[3]</sup>和 Ramsey 等<sup>[4]</sup>率先认识到芯片-质谱技术平台在现代生物试样分析中的发展前景, 并开展了奠基性的研究工作。微流控芯片与质谱的联用产生了相辅相成的效果。芯片上较易实现的试样前处理操作, 如固相萃取 (SPE)、酶解、预浓集和分离等均有利于质谱的高效率、高灵敏度和高通量检测, 正满足了基因组学与蛋白质组学的分析需要。

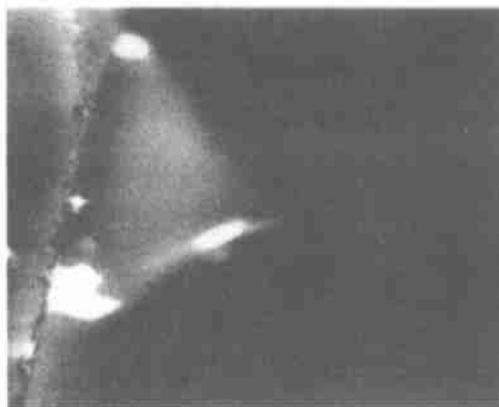
## 1 微流控芯片-电喷雾电离-质谱联用技术的发展状况

### 1.1 联用装置的接口技术

微流控芯片-ESI/MS 系统中的关键部分是



(A)



(B)

图 1<sup>[4]</sup> A: 在芯片一端的槽道口形成的水滴;

图 1<sup>[4]</sup> B: 当在芯片和对电极间加 3 kV 电压时产生的泰勒锥和电喷雾现象

Fig 1<sup>[4]</sup> (A) Photomicrographs of a water droplet forced through a channel opening at the side of a microchip

Fig 1<sup>[4]</sup> (B) The Taylor cone and electro-spray generated from the same opening when a 3 kV potential is applied between the microchip and the target electrode

1.1.2 外接喷雾毛细管型 在芯片出口处外接一段毛细管实现电喷雾, 此时的喷雾段采用标准的毛细管电泳-质谱接口模式。此种接口易实现良好的喷雾状态。早期的设计多采用标准的喷雾化气的同轴鞘流结构 (见图 2), 或者是较简单的液接界形式 (见图 3)。这两种方式共有的缺点是稀释了待测物, 延长了组分的迁移时间, 使分辨率和灵敏度下降。纳喷雾概念的提出使该接口得到简化——将一小段喷口拉细至 10  $\mu\text{m}$  或更小

接口。接口的设计, 可归纳为以下三种形式: 初期: 出口直接喷雾型; 发展改进: 外接喷雾毛细管型; 新型的集成一体化模式。

1.1.1 出口直接喷雾型 在微流控芯片槽道口流出的待分析溶液在电场作用下直接喷雾电离, 该接口直观简单, 适用于连续流试样分析; 但不满足高灵敏的检测要求。由于对基材的高度浸润性, 试样流在芯片的出口端平面上极易铺展 (图 1)<sup>[4]</sup>, 在槽道口形成水滴, 当在芯片和对电极间加 3 kV 电压时产生泰勒锥和电喷雾现象, 引起组分的稀释和区带增宽效应。有两种补救措施用以缩小喷雾液珠尺寸: 在槽道出口外围涂布或衍生化一层憎水材料<sup>[3]</sup>, 如进行硅烷化; 在芯片上另开一条通道与喷雾口相接, 内通辅气流帮助液珠迅速气化<sup>[5]</sup>。

的毛细管连接到芯片上<sup>[6,7,8]</sup>, 从而节省一整套辅流或液接的部件, 更小的喷雾滴也有助于提高分析的灵敏度和分辨率。

其次, 该种接口能够方便地控制喷雾电压。ESI 电压往往施加于鞘流的不锈钢外套管或液接界点上。也有报道利用芯片内的一层导电玻璃膜接触毛细管与槽道相连的嵌入部分来实现加压, 可适用于切平的喷头和拉细的喷针<sup>[11]</sup>。对于纳喷雾, 普遍采用的方式有:

将金属(Au, Ag)或导电高分子层镀于毛细管喷口处,方式简单,但镀层的强度和使用寿命尚有待提高;

在喷雾毛细管末端插入电极丝,此法易产生气泡;

用一不锈钢三通连接外接毛细管和喷针毛细管,使既用以喷雾又作为毛细管电泳一极的

电压加于其上。

用芯片上的毛细管电泳电压趋动喷雾,但因对喷雾口电压的控制较差,故较少采用。

最后,采用鞘流和液接界面的喷雾毛细管可被拆卸和更新,延长石英芯片的使用寿命。对于纳喷雾毛细管,有报道采用容易去除的环氧树脂粘合剂实现毛细管的更新<sup>[11]</sup>。

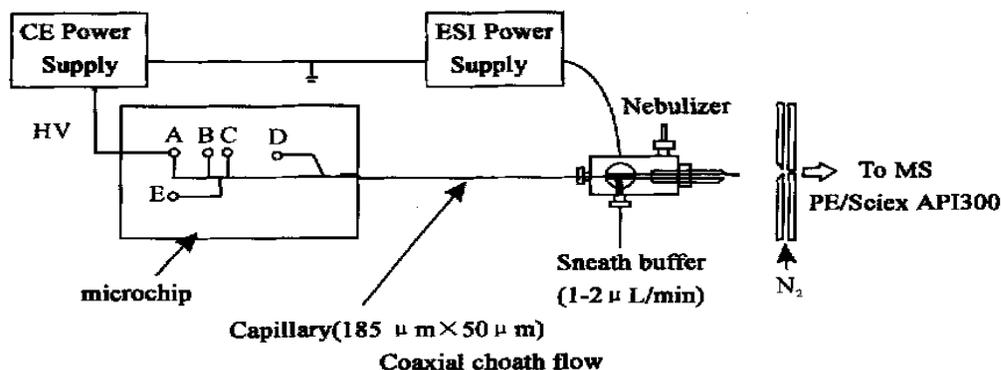


图 2<sup>[9]</sup> 配有鞘流和雾化器的芯片-电喷雾装置图

Fig 2<sup>[9]</sup> Electro-spray device with sheath flow and nebulizer gas

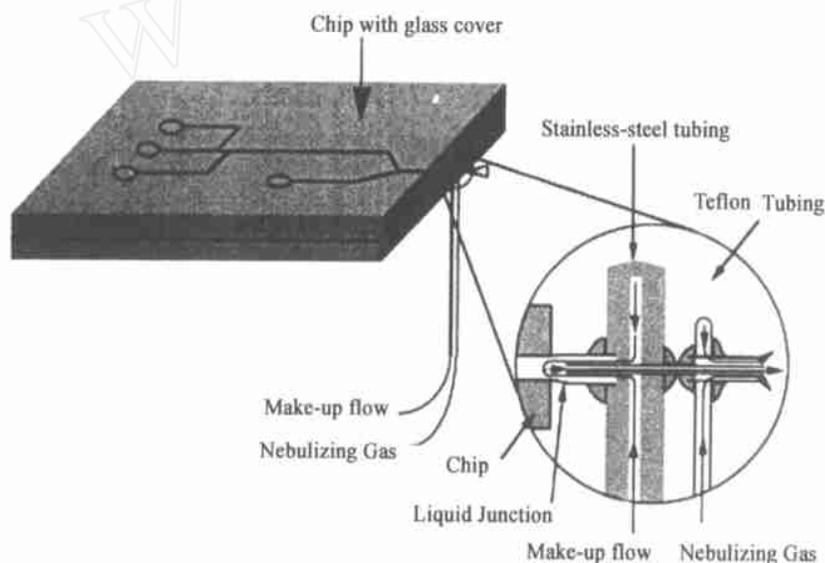


图 3<sup>[10]</sup> 液接界式的玻璃制芯片的结构图以及与之匹配的电喷雾组件放大图

Fig 3<sup>[10]</sup> Schematic drawing of the glass chip-based CE/MS apparatus and the expanded view of the coupled microsyringe

Karger 试验组比较过辅气流的直接喷雾式芯片-质谱与液接界的芯片-质谱二者的分离效率<sup>[5]</sup>。他们发现对于相同体系的分析后者塔板数高达 300000/m, 数倍于前者的 70000/m。尽管该方式优于第一种接口,但通常认为,液接界难以

避免的死体积仍会使分离效率也有所损失。这就是纳喷雾与一体化喷口崛起的主要原因。

### 1.1.3 集成一体化模式与高聚物芯片的发展

该模式设想把电喷雾部分整体加工在芯片结构内,高分子材料由于其良好的加工性能,低

廉的成本、种类性质的多样化<sup>[12]</sup>成为首选基质; 微电子机械系统 (Microelectromechanical system, MEMS) 为一体化的芯片质谱 (Chip-MS) 的实现提供了加工技术。

Smith 率先报道的与质谱联用的等电聚焦芯片采用激光烧蚀在 PET 基材上加工出尖端喷头, 辅流和辅气的通道也直接刻蚀于芯片上<sup>[13]</sup>。Lee 利用 MEMS 技术在芯片上接合了更精细的纳喷头<sup>[14]</sup>, 制作出的聚对二甲苯喷雾针, 性能既

达到了石英纳喷针的水准, 又有很高的机械强度。

一种更简单的一体化喷头的制作方法是在 PMMA (聚甲基丙烯酸甲酯) 芯片上直接机械加工出夹角合适的三角形喷嘴<sup>[15]</sup>。Daniel 采用 3 层光刻技艺在 PDM S (聚二甲基硅氧烷) 基材上制作成 16 通道并行的电喷雾芯片, 成 60 角的三角状喷头一字排开, 检测限低于  $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ <sup>[16]</sup> (见图 4)。

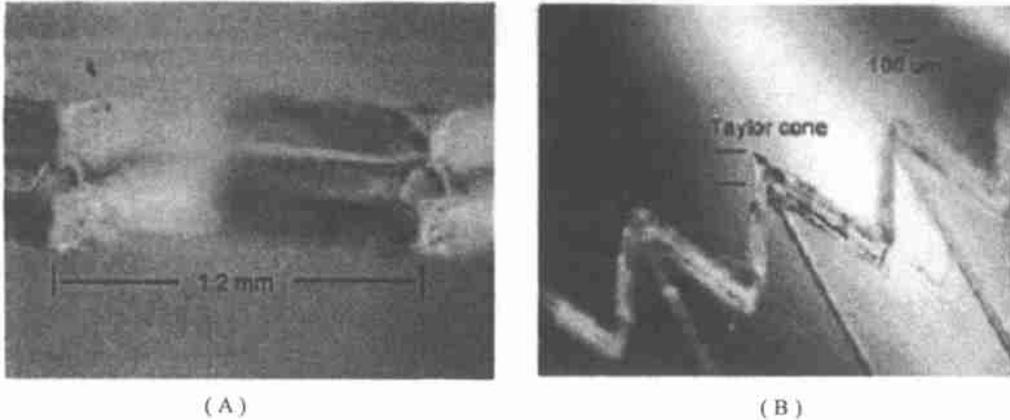


图 4<sup>[16]</sup> (A) 多通道的电喷雾尖端; (B) 多通道电喷雾现象  
(样品:  $10 \mu\text{mol}$  的 ACTH1-17, 溶于含 0.1% 甲酸的 1:1 甲醇水溶液)

Fig 4<sup>[16]</sup> Photomicrographs of (A) electro spray nozzles of multichannels and  
(B) electro spray phenomenon of multiple-spray microdevice

(sample:  $10 \mu\text{mol}$  ACTH1-17 dissolved in 1:1 aqueous methanol containing 0.1% formic acid)

文献<sup>[17]</sup>报道利用 MEMS 技术加工出一种形状独特的圆盘式喷头: 以硅为基质, 喷针直径小至  $15 \mu\text{m}$ 。该纳喷雾芯片分析的重现性比拉尖的毛细管稍优。

PMMA 是高聚物芯片最早选用的材料之一。Soper 实验组用 HF 适当腐蚀石英毛细管, 使之插入固定在芯片槽道内, 外露部分与纳喷针相连。该系统对标准蛋白和肽的 FT-ICRMS (傅立叶变换-离子回旋共振质谱) 分析可持续较长时间, 且无交叉污染<sup>[18]</sup>。最近又有报道在 PMMA-Chip 槽道口粘合毛细管纳喷头 (镀银) 做 Chip-MS/MS 分析, 并应用到  $1.5 \text{ pmol}$  的牛血清白蛋白的胶上酶解产物的鉴定<sup>[8]</sup>。

PDM S 是另一种被普遍选用的优良基质。注塑成型使其加工变得相当方便, 利于规模化; 其固有的化学性质—表面憎水且无电荷, 极大程度缓解了普通玻璃芯片对生物大分子的吸附问题, 与制作单通道芯片而后外接毛细管连质谱的

工作相比<sup>[19]</sup>, PDM S 的加工特性有利于实现多通道或集成化芯片设计, 从而体现出芯片的阵列化优势。

高分子材料的憎水性为优化直接型电喷雾开辟了一条新途径。Girault 基于 PET (polyethylene terephthalate) 制成的芯片可防止液滴在芯片端面的铺展, 从而使直接喷雾式的质谱分析对马肌红蛋白的检测限达到  $\text{pmol}$  级<sup>[20]</sup>。

高聚物种类的多样化使材料的选择有了广阔的空间。Henion 将常用于磁盘生产的材料 Zeonor 应用到高聚物芯片领域<sup>[21]</sup>。Zeonor 1020 对普通有机溶剂的难溶性和有利粘合、修饰的键合性质是其主要优点。该芯片配有仅长  $1 \text{ cm}$  的电喷雾部件 (见图 5)<sup>[21]</sup>, 对进样  $0.2 \text{ nmol}$  的肉毒碱、酰基肉毒碱和丁基肉毒碱的混合物做快速分离后质谱分析, 分离效率在 1650~18000 塔板。

尽管高聚物芯片与质谱联用系统在生化样

品处理分析中的光明前景已被公认,但基材转换带来的新问题仍不容忽视。高分子材料缺乏适用于电泳分析的表面化学修饰技术,这会影响到芯片的分离分析性能,限制其移植更多种的分离模式。另一方面,化学污染和对有机溶剂的相容性

也需要慎重对待。

## 1.2 微流控芯片的模式和功能的拓展

微流控芯片在生命物质分析尤其是核酸、蛋白、肽等的分离鉴定中所起的作用正日趋多样化。

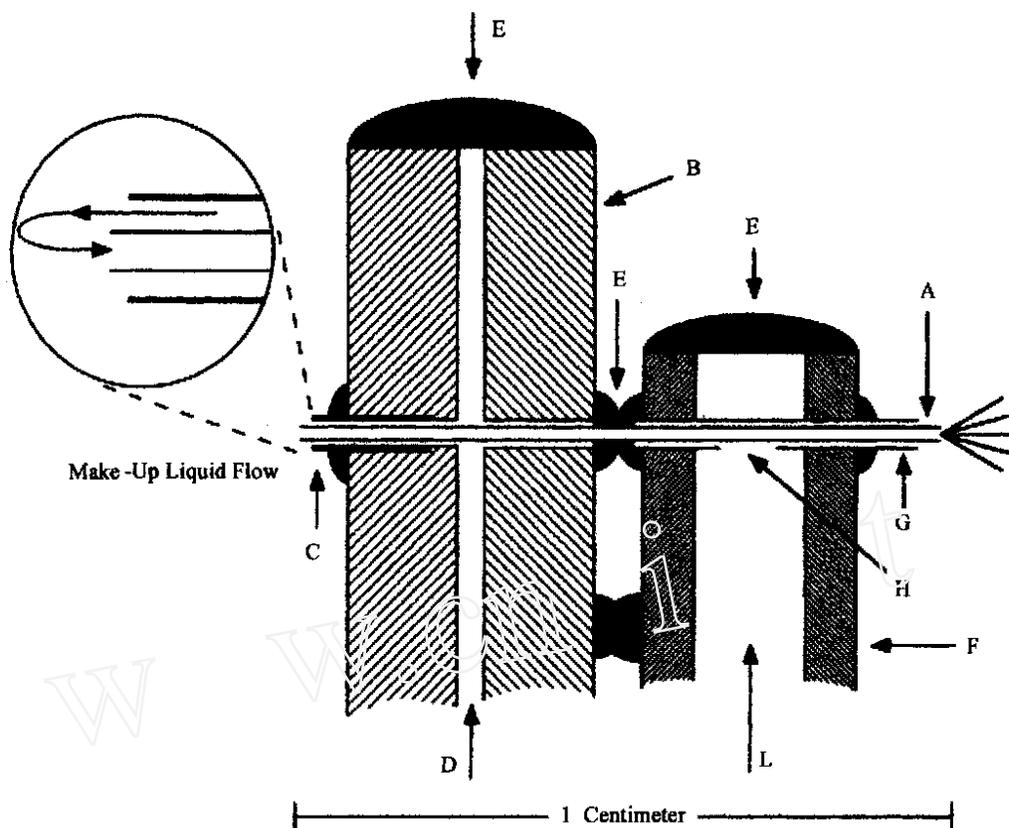


图 5<sup>[21]</sup> 用于同芯片分离装置相接的微型化离子喷雾源

- (A) 1 cm × 31 规格不锈钢套管; (B) 0.05 cm i d × 0.16 cm o d 不锈钢管;  
 (C) 0.3 cm × 23 规格不锈钢套管; (D) 辅流入口; (E) 环氧胶封口;  
 (F) 0.16 cm 聚四氟乙烯管; (G) 0.4 cm × 23 规格不锈钢管套; (H) 小孔; (I) 入气孔

Fig 5<sup>[21]</sup> Micro ion spray source designed for interfacing to chip-based separation devices incorporating a self-contained liquid junction

- (A) 1 cm × 31 gauge stainless tubing; (B) 0.05 cm i d × 0.16 cm o d stainless tubing;  
 (C) 0.3 cm × 23 gauge stainless tubing; (D) makeup liquid entrance; (E) epoxy seal;  
 (F) 0.16 cm Teflon tubing; (G) 0.4 cm × 23 gauge stainless tubing;  
 (H) hole; and (I) gas inlet

### 1.2.1 分离模式的多样化

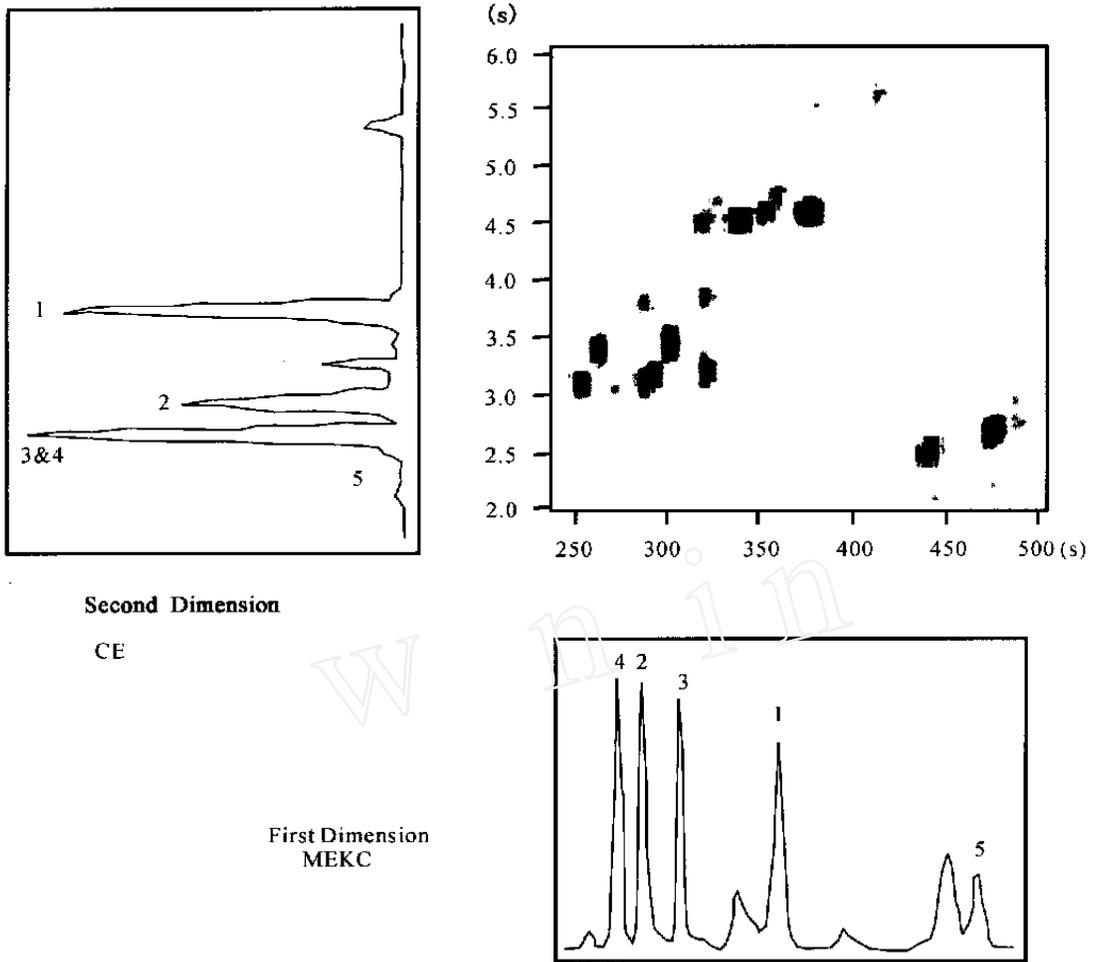
除了毛细管区带电泳外,毛细管等电聚焦也已成功应用于 Chip-MS<sup>[22]</sup>。CIEF 可提供蛋白质按等电点大小排列的信息,而质谱恰好提供了蛋白质按分子量排序的信息。CIEF-MS 可实现蛋白质的快速二维分离和鉴定,与二维凝胶电泳-质谱相比,分析周期可从几周缩短到一天甚至几小时,因此被视为极有前途的高通量分析技术。

最近有报道在芯片槽道内建立横向式 IEF 的 PH 梯度,并用 CCD 技术实时观测了 BSA 蛋白在两极间的聚焦情况,不过该系统还未与质谱联用<sup>[23]</sup>。

在芯片上建立二维的分离系统,有望提高复杂样品的分离度。J. M. Ramsey 率先实现了 MEKC-CZE 的二维芯片,用以分离细胞色素 C 的酶解产物,峰容量 500~ 1000<sup>[9]</sup>,第一维流出

物每隔 4 s 进入第二维(见图 6)。选择这两种模式是出于二者相互正交, 均无需考虑槽表面的特殊处理、流动相体系的较好匹配等问题。另一种二维芯片系统由第一维等速电泳(IIP)和第二

维区带电泳构成<sup>[10]</sup>。严格意义上说, 此处 ITP 是一种对 CZE 样品的预浓缩、纯化技术, 能够提高电导检测的灵敏度。



Second Dimension  
CE

First Dimension  
MEKC

图 6<sup>[9]</sup> FTC 标记的标准肽段的一维、二维分离谱图

(1) 亮氨酸脑啡肽; (2) 血管紧张肽 I; (3) 血管紧张肽 III; (4) 神经紧张肽; (5) 舒缓激肽

Fig 6<sup>[9]</sup> 1D and 2D separations of FTICK- labeled peptide standards (Effluent from the first dimension injected every 4 s into the second)

(1) leucine enkephalin; (2) angiotensin I; (3) angiotensin III;

(4) neurotensin; (5) bradykinin

### 1.2.2 微流控芯片结构设计多元化

“多元化”不仅指芯片丰富的槽道样式和进样形式, 更包括芯片上实现的多通道、阵列化结构。微流控系统的显著优势之一就是它能同时或依次处理多份样品, 促进大规模、高通量分析平台的建立。多喷口的结构<sup>[3]</sup>是实现复元化分析的最基本方式; 另一种形式则将多路待测溶液通过同一喷口电离送入质谱。Aebersold 与其合作者就展示了对 3 份<sup>[24]</sup>和 6 份<sup>[25]</sup>样品经同一喷雾口

进行自动连续流分析的芯片结构。电压依次加于各个进样池, 使每份蛋白样品流经槽道后在同一处电喷雾。

Karger<sup>[26]</sup>研究组制成的以 PDM S 为基材的 96 通道电喷雾芯片有力证实了阵列化芯片高效的分离分析性能。其每根槽道都与一外接毛细管匹配, 以 N<sub>2</sub> 作为液流驱动力。整个装置可由计算机精确调节喷雾口与质谱进样口的相对位置(见图 7)<sup>[26]</sup>。该系统在 480 秒内分析了 96 个肽

样品,并用于确定艾滋病病毒蛋白酶抑制剂的抑制常数。

### 1.2.3 微流控芯片自身功能的多样化

#### 从单喷雾到预分离

由于复杂样品成分之间的互相干扰会引起电喷雾信号的压制和背景噪音的上升,质谱对实际体系的分析需要预分离。

较早的预分离是在外接毛细管部分进行。

Figey 等在芯片外的转移与微喷雾毛细管间填

充了 C-18, 利用溶剂梯度做反相萃取, 应用于双向凝胶分离后的蛋白鉴定, 检测限达  $0.1 \text{ nmol}^{[27]}$ 。另一种方式是直接在芯片上电进样而后快速分离。Li 首次试验了多种涂层和鞘流来实现电喷雾, 对肽混合物进行 Chip-MS/MS 分析。仅有  $150 \text{ fmol}$  的蛋白酶解产物就足够数据库搜索鉴定蛋白, 而使用 Chip-MS/MS 进行肽段测序的检测限为  $45 \text{ amol}/\mu\text{L}$ 。

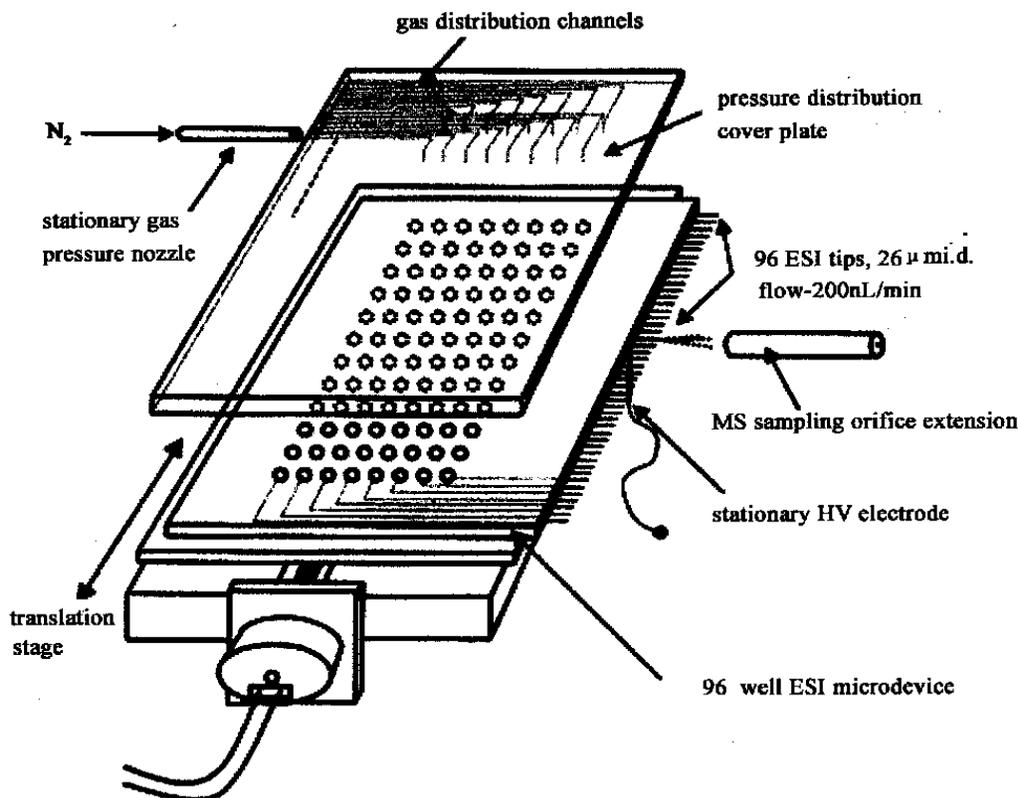


图 7<sup>[26]</sup> 96-阵列微流控芯片-质谱联用体系图

(每条进样槽都与各自对应的一根毛细管相连, 采用气体动力进样)

Fig 7<sup>[26]</sup> Exploded view of the 96-array microchip-MS system (Each of the channels is connected to a capillary correspondingly and pressure injection is adopted)

在外接式设计中,若芯片上实现在线分离,接口的死体积是决定其分离效率的关键因素。图 8 表示两种喷嘴毛细管,其一有约  $0.7 \text{ nL}$  的死体积,另一种基本消除死体积。实验表明<sup>[28]</sup>,使用前者与分离芯片相连获得的实际塔板数仅为理论预测值的 16~25%,而后者可达到 98%。

#### 多种样品预处理的集成

微流控芯片为实现微型化分析处理的形式和功能提供了一个“创造的平台”。已发展的微全

分析系统可进行化学反应、DNA 扩增、蛋白的酶解、分离检测等多种操作。对于 Chip-MS 系统,微流控芯片可被视为质谱分析的预处理工具,它进行反应、分离的特定操作以辅助质谱获得更精确、灵敏的检测信号。

针对微型化芯片对质谱检测限提出的“苛刻”要求,在线的样品预浓缩有效缓解了现阶段质谱灵敏度不足的矛盾。目前,芯片的预浓缩技术包括样品堆积 (sample stacking, SS), 等速电

泳(ITP)和电驱动富集。

样品堆积技术是基于样品缓冲液和分离缓冲液电导值的差别, 需要预知样品信息并且进样量受到芯片容积的限制。Ramsey 等在芯片上实现该技术后发现样品浓度可提高 14 倍<sup>[29]</sup>。Li 则发现该技术对几百皮升溶液浓缩的效果比双“T”进样高 3~50 倍<sup>[30]</sup>。芯片的此种功能使得质谱分析亚纳摩尔(subnanomole)量的肽混合物

成为可能。在 ITP 方面, 有报道它可使  $10^{-5}$  mol 的肽混和物的分析灵敏度和分辨率提高一个数量级<sup>[31]</sup>。

固相萃取(SPE)是一种适合芯片的理想的预浓缩技术。其优点是:

SPE 依赖样品和萃取相的相互作用, 不必精确控制缓冲液条件;

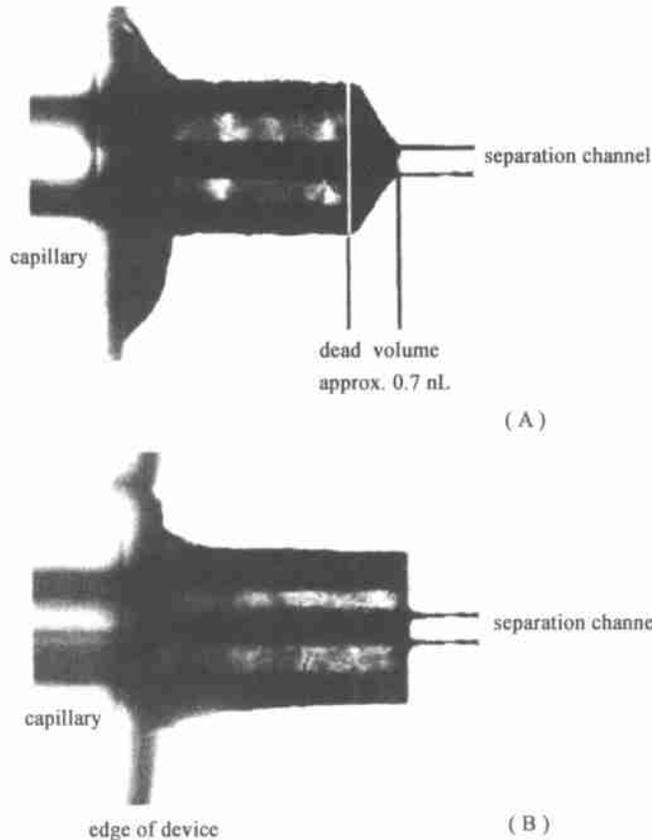


图 8<sup>[28]</sup> 以最小死体积建立毛细管与芯片槽道接口的两种方式  
(A) 接口为圆锥形(有死体积); (B) 毛细管插入口为平底(无死体积)

Fig 8<sup>[28]</sup> Two methods of constructing a capillary/device interface with minimal dead volume

(A) shows a coupling with a frusto-conical hole showing minimal but significant dead volume (0.7 nL); while (B) shows a capillary fitted into a flat-bottomed hole eliminating the dead volume associated with the previous connection. Small dead volumes were found to seriously degrade the performance of on-chip separations

SS、ITP 的分析量受限于分离槽道和毛细管体积, SPE 则允许预浓缩溶液超过微升级;

SPE 能够高选择性的富集样品, 去除干扰物。

芯片上的 SPE 与质谱联用, 起初只是离线

模式。Harrison 等开展了进一步研究, 在芯片槽道内填充固相颗粒用于分离富集, 实现了在线的 SPE 和电色谱<sup>[32]</sup>。

除预浓缩之外, 样品的纯化也是影响 ESI-MS 的焦点问题之一, 尤其是小分子盐类会严重

妨害蛋白和肽的准确鉴定。Smith 等<sup>[33]</sup>借助芯片的分离能力纯化了供质谱分析的样品,质量过大或过小的分子在电喷雾前被这种微透析芯片滤除。

上述这些富有前瞻性的工作推动了多功能集成化芯片的诞生及发展。

## 2 Microchip 与 MALDI MS 的现有结合方式

就目前发展情况而言, MALDI 离子源具有以下 ESI 不可替代的优点:

(1) 对样品的组成限制低, 能耐高温浓度盐,

非挥发性缓冲剂(包括电泳需要的硫酸盐、磷酸盐、硼酸盐等)。

(2) 灵敏度高。样品量只需 1 pmol 甚至更低。

(3) 谱图中单电荷、双电荷的分子离子峰很强, 便于峰信号重组。

芯片技术与 MALDI 的联合至今仍处于萌芽阶段, 其中存在着不少限制因素。最早的设计是利用微加工技术制作含 100 个微孔阵列的芯片, 用于容纳供 MALDI MS 分析的 DNA 样品<sup>[34]</sup>。显然, 这只是将芯片当作 MALDI 的点样板, 并不是优势互补的联用。

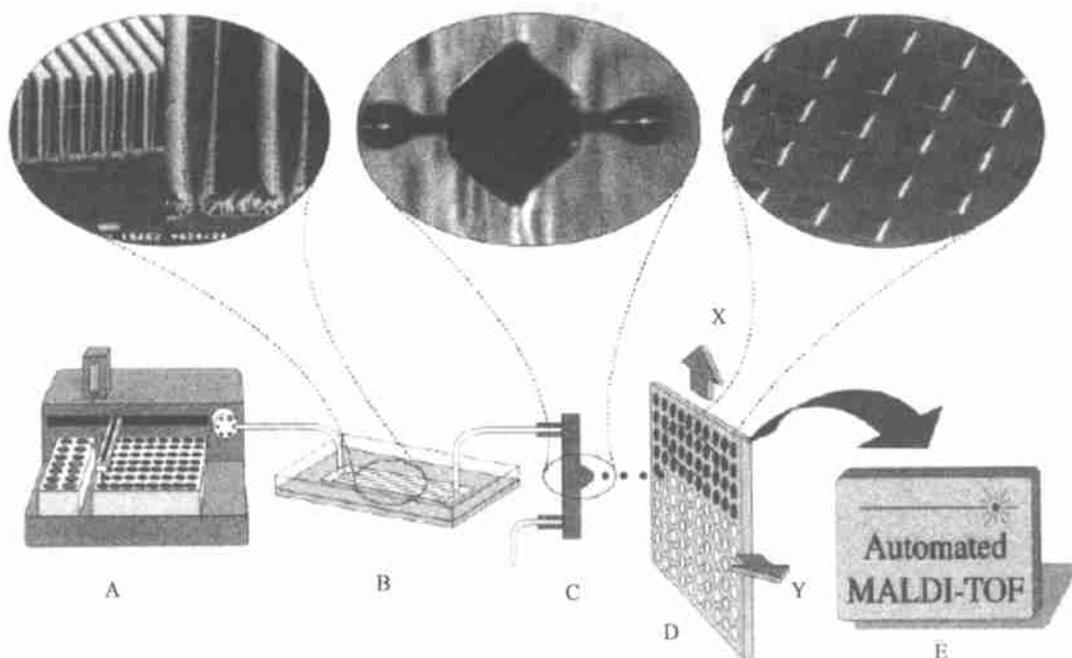


图 9<sup>[35]</sup> 用于蛋白处理的全分析系统

(A) 每次运行可以 576 个样品进行还原和烷基化的样品预处理仪;

(B) 微芯片上固定的酶反应器; (C) 微加工的液体喷射器;

(D) 带有高密度纳米孔的靶盘; (E) MALDI-TOF MS 分析

Fig 9<sup>[35]</sup> Total analysis system and its different parts

(A) automated sample pretreatment and injection;

(B) the enzyme reactor fixed on  $\mu$  chip;

(C) the microdispenser used to deposit sample into  $\mu$  vials;

(D) shallow nanovials on the MALDI target plated; and

(E) automated MALDI-TOF MS analysis

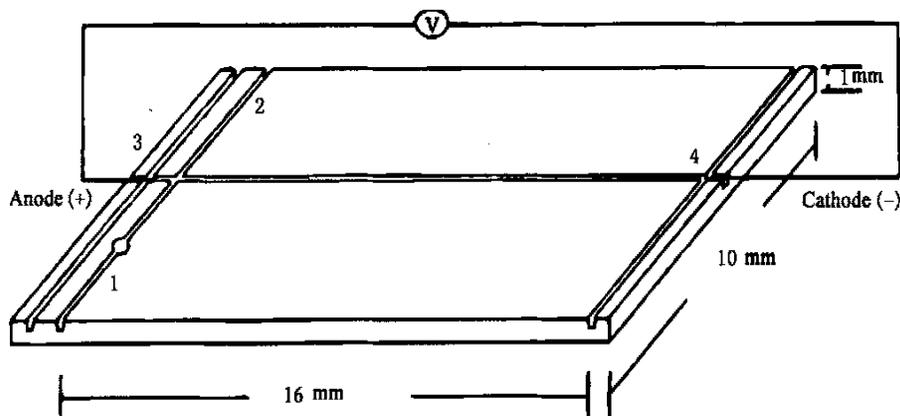
近年的两项工作显示出 Microchip & MALDI MS 联合的潜力。Nilsson 提出了一整套有望代替蛋白组学传统分析平台的系统, 微流控芯片在其中作为蛋白酶解反应器<sup>[35, 36]</sup>。整条路线如图 9 所示。芯片是由多孔硅刻蚀而成, 可在

1~3 min 内在线酶解 1  $\mu$ L 蛋白样品, 后连的微型分散器完成皮升量的产物转移, 最终进入 MALDI-TOF 系统。该系统在 3.5 h 内分析了 100 份蛋白试样。

立足实现二者的直接联用, 瓶颈问题是一方

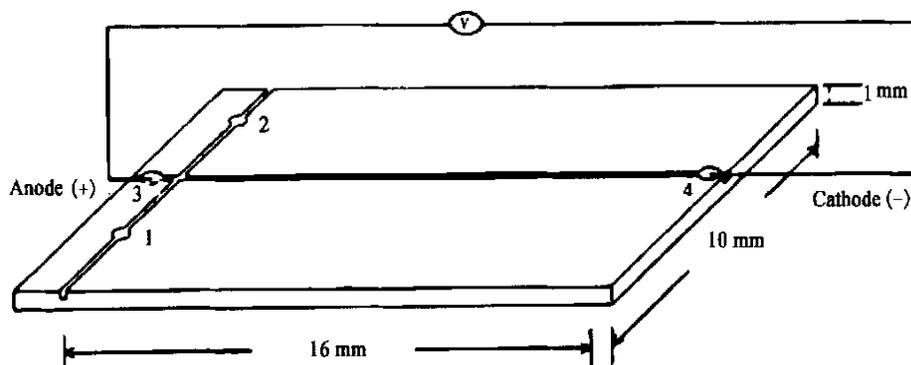
为动力学液流体系, 另一方则是固态晶化——MALDI 通常要求样品与基质共结晶。Lebrilla<sup>[37]</sup>等率先提出的联用方式为: 寡糖和肽的混合物在电驱动下流过 ROACHE (rapid open-access channel electrophoresis, 快速开管电泳) 芯片的敞开通道, 得到分离, 芯片槽道直接暴露于

MALDI 激光束下(见图 10); 溶剂蒸发后, 预先加于缓冲液中的基质与溶质共结晶; 而后芯片被转移进入特殊设计的 FT-MS 的 MALDI 源, 由激光扫描芯片通道使待测分子电离而检测。这是一种崭新的适应于蛋白质高通量、高分辨、快速、在线分析要求的二维技术平台。



Channel width: 250  $\mu\text{m}$   
Channel depth: 250  $\mu\text{m}$   
Diameter of reservoirs: 1.4 mm

(a) ROACHE I Chip



Channel width: 250  $\mu\text{m}$   
Channel depth: 250  $\mu\text{m}$

(b) ROACHE II Chip

图 10<sup>[37]</sup> ROACHE I (a) 和 ROACHE II (b) 芯片构造示意图  
(芯片槽道直接暴露于 MALDI 激光束下)

Fig 10<sup>[37]</sup> Schematics of ROACHE I (a) and ORACHE II (b) Chips  
(The channels are open for exposure to the MALDI laser beam)

### 3 展望

微分析系统的总体目标是缩小那些可以获

益于微型化的分析元件。在实现芯片与质谱耦合的同时, 众多研究者投入于如何实现微流控装置

上的多样品处理环节。目前的研究成果已使微芯片上的简单预处理成为可能,未来在该领域中的进展将继续丰富微流控工具箱的内容,使之能高效地完成对大部分样品的处理工作,从而促使整个分析平台的操作速度、重现性和自动化程度的显著提高。在蛋白质组学领域,可以期望,微流控系统与其他分析技术的多维组合或其自身的多维模式有助于寻找代替 2D-gel 的新型分离分析路线。

除进行质谱前的样品处理以外,芯片在与药物开发相联系的应用领域的潜力也有待挖掘。制药工业已开始发展组合化学和固相合成的方法,从极大量的候选药物中快速生成和筛选化合物库,从而解决药物筛选中待鉴定物质数量过多的问题。未来的集成化、阵列化、自动化的芯片-质谱技术在该领域的应用价值不容忽视。

#### 参考文献:

- [1] Wilhelm M, Shevchenko A, Houthaeve A, et al. Femtomole Sequencing of Proteins from Polyacrylamide Gels by Nano-electrospray Mass Spectrometry. *Nature*, 1996, 379: 466
- [2] Lu Y, Zhou F, Shui W Q, et al. Pulsed Electrospray for Mass Spectrometry. *Anal Chem.*, 2001, 73, 4748
- [3] Xue Q, Foret F, Dunayevskiy Y M, et al. Multichannel Microchip Electrospray Mass Spectrometry. *Anal Chem.*, 1997, 69: 426
- [4] Ramsey R S, Ramsey J M. Generating Electrospray from Microchip Devices Using Electroosmotic Pumping. *Anal Chem.*, 1997, 69: 1174
- [5] Zhang B, Liu H, Karger B L, et al. Microfabricated Devices for Capillary Electrophoresis-Electrospray Mass Spectrometry. *Anal Chem.*, 1999, 71: 3258
- [6] Lazar I M, Ramsey R S, Sundberg S, et al. Subattomole-Sensitivity Microchip Nanoelectrospray Source with Time-of-Flight Mass Spectrometry Detection. *Anal Chem.*, 1999, 71: 3627
- [7] Vrouwe E X, Gysler J, Tjaden U R. Chip-Based Capillary Electrophoresis with an Electrodeless Nanospray Interface. *Rapid Commun Mass Spectrom.*, 2000, 14: 1682
- [8] Chen S H, Sung W C, Lee G B, et al. A Disposable Poly(methylmethacrylate)-Based Microfluidic Module for Protein Identification by Nanoelectrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry. *Electrophoresis*, 2001, 22: 3973
- [9] Macounova K, Cabreran C R, Yager P. Concentration and Separation of Proteins in Microfluidic Channels on the Basis of Transverse IEF. *Anal Chem.*, 2001, 73: 1627.
- [10] Kaniansky D, Masák M, Bielyckov AJ, et al. Capillary Electrophoresis Separations on a Planar Chip with the Column-Coupling Configuration of the Separation Channels. *Anal Chem.*, 2000, 72: 3596
- [11] Lazar I M, Iulia M, Ramsey R S, et al. Novel Microfabricated Device for Electrokinetically Induced Pressure Flow and Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *J. of Chromatography A*, 2000, 892: 195
- [12] Soper S A, Ford S M, Shize Q, et al. Fabrication of Metallic Microstructures Using Exposed, Developed Silver Halide-Based Photographic Film. *Anal Chem.*, 2000 Oct 1; pp. 645 A ~ 651 A.
- [13] Wen J, Lin Y H, Xiang F, et al. Microfabricated Isoelectric Focusing Device for Direct Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Electrophoresis*, 2000, 21: 191.
- [14] Licklider L, Wang X, Desai A, et al. A Micro-machined Chip-Based Electrospray Source for Mass Spectrometry. *Anal Chem.*, 2000, 72: 367.
- [15] Yuan C H, Shiea J. Sequential Electrospray Analysis Using Sharp-Tip Channels Fabricated on a Plastic Chip. *Anal Chem.*, 2001, 73: 1080
- [16] Kim J S, Knapp D R. Miniaturized Multichannel Electrospray Ionization Emitters on Poly(dimethylsiloxane) Microfluidic Devices. *Electrophoresis*, 2001, 22: 3993
- [17] Schultz G A, Corso T N, Prosser S J, et al. A Fully Integrated Monolithic Microchip Electrospray Device for Mass Spectrometry. *Anal Chem.*, 2000, 72: 4058
- [18] Meng Z J, Qi S Z, Soper S A, et al. Interfacing a Polymer-Based Micro-machined Device to a Nanoelectrospray Ionization Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometer. *Anal Chem.*, 2001, 73: 1286
- [19] Chan J H, Timpeman A T, Qin D, et al. Microfabricated Polymer Devices for Automated

- Sample Delivery of Peptides for Analysis by Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Anal Chem.*, 1999, 71: 4437.
- [20] Rohner T C, Rossier J S, Girault H H. Polymer Microspray with an Integrated Thick-Film Microelectrode. *Anal Chem.*, 2001, 73: 5353
- [21] Kameoka J, Craighead H G, Zhang H W, et al. A Polymeric Microfluidic Chip for CE/MS Determination of Small Molecules. *Anal Chem.*, 2001, 73: 1935
- [22] Wen J, Lin Y, Xiang F, et al. Microfabricated Isoelectric Focusing Device for Direct Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Electrophoresis*, 2000, 21: 191
- [23] Rocklin R D, Ramsey R S, Ramsey J M. A Microfabricated Fluidic Device for Performing Two-Dimensional Liquid-Phase Separations. *Anal Chem.*, 2000, 72: 5244
- [24] Figeys D, Ning Y, Aebersold R. A Microfabricated Device for Rapid Protein Identification by Microelectrospray Ion Trap Mass Spectrometry. *Anal Chem.*, 1997, 69: 3153
- [25] Figeys D, Steven P G, McKinnon G R, et al. An Integrated Microfluidics-Tandem Mass Spectrometry System for Automated Protein Analysis. *Anal Chem.*, 1998, 70: 3728
- [26] Liu H, Felten C, Xue Q F, et al. Development of Multichannel Devices with an Array of Electrospray Tips for High-Throughput Mass Spectrometry. *Anal Chem.*, 2000, 72: 3303
- [27] Figeys D, Aebersold R. Nanoflow Solvent Gradient Delivery from a Microfabricated Device for Protein Identifications by Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Anal Chem.*, 1998, 70: 3721
- [28] Bings N H, Wang C, Skinner C D, et al. Microfluidic Devices Connected to Fused-Silica Capillaries with Minimal Dead Volume. *Anal Chem.*, 1999, 71: 3292
- [29] Jacobson S C, Ramsey M. Microchip Electrophoresis With Sample Stacking. *Electrophoresis*, 1995, 16: 481
- [30] Li J J, Wang C, Kelly J F, et al. Rapid and Sensitive Separation of Trace Level Protein Digests Using Microfabricated Devices Coupled to a Quadrupole-Time-of-Flight Mass Spectrometer. *Electrophoresis*, 2000, 21: 198
- [31] Zhang B, Liu H, Karger B L, et al. Microfabricated Devices for Capillary Electrophoresis-Electrospray Mass Spectrometry. *Anal Chem.*, 1999, 71: 3258
- [32] Oleschuk R D, Shultz-Lockyear L L, Ning Y, et al. Trapping of Bead-Based Reagents within a Microfluidic System: On-Chip Solid-Phase Extraction and Electrochromatography. *Anal Chem.*, 2000, 72: 585
- [33] Xu N X, Lin Y H, Hofstadler S A, et al. A Microfabricated Dialysis Device for Sample Cleanup in Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Anal Chem.*, 1998, 70: 3553
- [34] Little D P, Cornish T J, O'Donnell M J, et al. MALDI on a Chip: A Analysis of Arrays of Low-Femtomole to Subfemtomole Quantities of Synthetic Oligonucleotides and DNA Diagnostic Products Dispensed by a Piezoelectric Pipet. *Anal Chem.*, 1997, 69: 4540
- [35] Ekstrom S, Onnerfjord P, Nilsson J, et al. Integrated Microanalytical Technology Enabling Rapid and Automated Protein Identification. *Anal Chem.*, 2000, 72: 286
- [36] Miliotis T, Kjellstrom S, Nilsson J, et al. Capillary Liquid Chromatography Interfaced to Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry Using an On-Line Coupled Piezoelectric Flow-Through Microdispenser. *Mass Spectrom.*, 2000, 35: 369
- [37] Liu J, Tseng K, Garcia B, et al. Electrophoresis Separation in Open Microchannels: A Method for Coupling Electrophoresis with MALDI MS. *Anal Chem.*, 2001, 73: 2147

(下转第 99 页)

ples By using well-tested methods and appropriate sample preparation procedures, hair, serum, blood, urine and tissues samples can be analysed with good accuracy and precision. It has also been shown that despite the challenges clinical samples posed by trace element techniques. The high throughput multielement analysis can be carried out automatically by ICP-MS with excellent stability and reproducibility.

## REFERENCES

- [1] Houk R S Mass Spectrometry of Inductively Coupled Plasma. Analytical Chemistry, 1986, 58 (1): 97A ~ 105A.
- [2] Bosheng Guo. Recent Research Advance of Rare Earth in the Field of Biology. Chinese Rare Earths, 1999, 20(1): 64~ 68
- [3] Weijun Chen, Yuehua Gu, Guiwen Zhao. Effect of LaCl<sub>3</sub> on Growth of Tobacco Plants by Water Culture. Chinese Rare Earths, 1999, 20(1): 58~ 60

## 电感耦合等离子体质谱测定生物样品中超痕量稀土元素

刘虎生<sup>1</sup>, 王耐芬<sup>1</sup>, 薛 斌<sup>1</sup>, 徐厚恩<sup>2</sup>, 颜世铭<sup>2</sup>

(1. 卫生公共学院, 北京大学, 北京 100083;

2. 防护医学系, 江西医学院, 南昌 330006)

摘要: 本文描述了用电感耦合等离子体质谱仪分析生物样品中超痕量稀土元素的方法, 采用优良的测试方法和合适的样品处理程序, 对毛发、血清、血液和组织样品的稀土成份分析能够获得高的准确度和精密度, 检测限达到 7~ 26 pg/mL。GBW 09101 品稀土元素的回收率为 95~ 105%, 相对标准偏差为 2.6~ 4.2%。

关键词: 电感耦合等离子体质谱(ICP-MS); 超痕量; 稀土元素; 生物样品

(上接第 111 页)

## The Development and Foreground of Microfluidic Device Coupled to Bio-Mass Spectrometry

SHU IW en-qing, SU Jia, HUANG Zhen-yu, HUANG Yi, YANG Peng-yuan

(Department of Chemistry, Fudan University, Shanghai 200433, China)

**Abstract** Microfluidic devices have been coupled to mass spectrometers (MS) though their dimensions seem unlikely for marriage. Three types of interface designs are concluded for MS with electrospray ionization while some novel means is also reported to couple microchip to MALDI-TOF. The substrate of microfluidic devices cover both glass and plastic. Various integrated protein preparation and preconcentration procedures together with its trend toward multiplexing are also reviewed.

**Key words:** microfluidic device; micro chip; bio-mass spectrometry; development and foreground