用于分离蛋白质复合物的移液装置开发

Christop her M. Altenderfer，天普大学机械工程系

Frank N. Chang，天普大学生物系

Parsaoran Hutapea，教授（通讯作者）复合材料实验室，机械工程系，天普大学1947 N 12th Street，费城，宾夕法尼亚州 19027hutapea@temple.edu，电话：(215) 204-7805，传真：(215) 204-4956

本项目旨在开发一种自动化装置，用于在疏水膜上点样蛋白质样品，以配合 Chang 和 Yonan 于 2008 [1]开发的专利电泳方法。该新方法直接在疏水印迹膜上进行电泳，不同于以往常用的二维聚丙烯酰胺凝胶法等方法 [2, 3]。这种新的电泳方法将处理时间大幅缩短至约 40 分钟，而二维聚丙烯酰胺凝胶电泳法则可能需要一至两天。为实现蛋白质及蛋白质复合物的有效分离，研究人员建立了在疏水印迹膜上点样的特殊方法。这些点样方法与专利电泳方法 [1] 结合使用，可实现有效分离。该自动化装置能够有效复现这些可重复且不依赖操作者的特殊方法。该装置旨在非变性条件下有效地点样并分离蛋白质复合物及单一蛋白质，从而消除手动点样法造成的差异。

所提出的两种自动化方法均使用气动滑台，使移液管沿直线向下移动，从而实现可重复的点样。采用专利电泳方法 [1], 分离蛋白质的效果高度依赖点样方法。即使是遵循特定操作流程的人工操作者，点样后也难以沿疏水膜表面充分分离蛋白质。因此，我们设计了一种能够最大限度减少差异的装置。后续实验表明，该装置能够稳定地产生蛋白质分离效果。

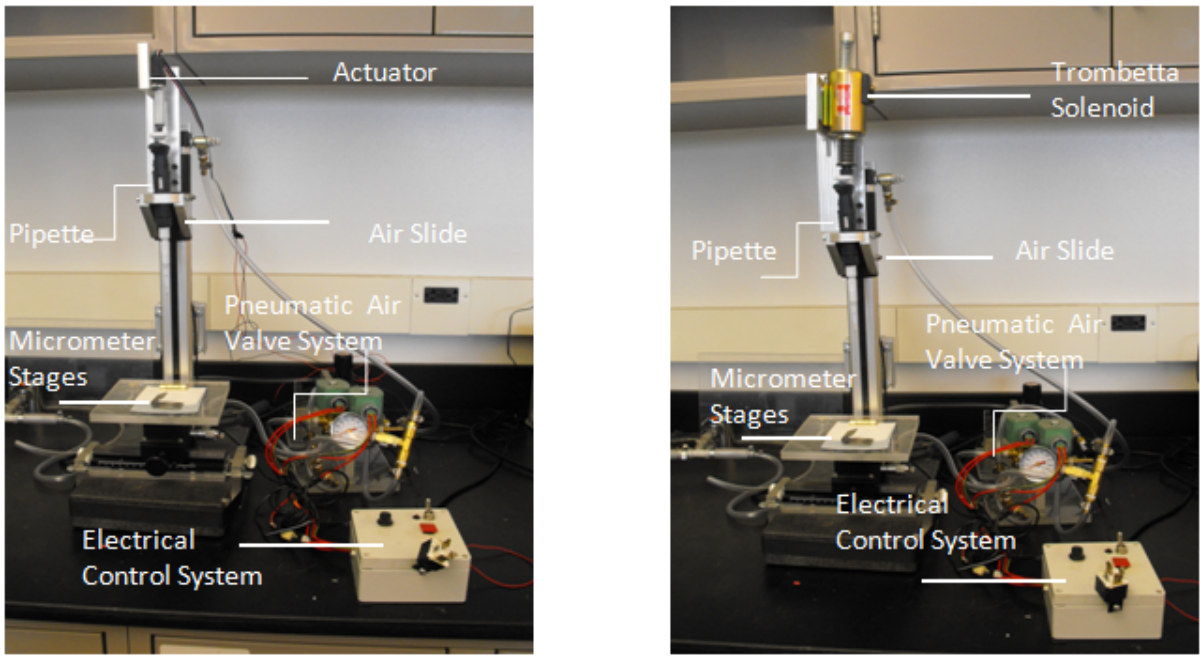


图 1. 设备系统

图 1 展示了所提出的两种在疏水表面点样蛋白质的方法。据信，每种方法各有独特优势。成功的人工测试结果表明，施力对于获得良好的电泳效果至关重要。

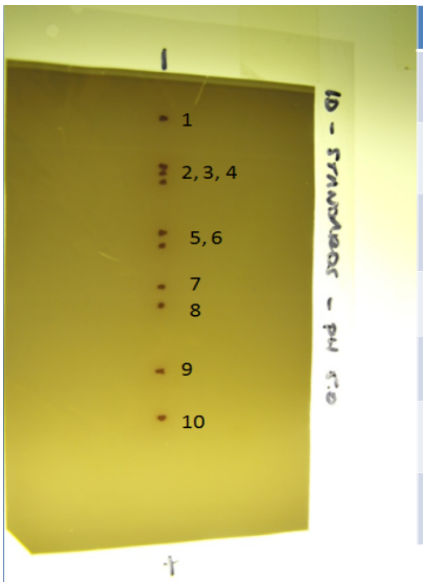
左侧的触碰提起法使用执行器对移液器吸头预先施加压力，使样品的 70-80% 悬挂在吸头上。空气滑块沿直线向下移动时，样品触及膜表面，毛细作用便会将样品从吸头吸出，从而完成点样。触碰提起法有助于尽量减小接触面积，因为向上运动会使样品形成类似“好时之吻”的形状。通过尽量减小接触面积，蛋白质能够堆叠在膜表面，从而防止膜与表面发生结合。蛋白质发生结合会妨碍它们沿膜表面有效分离。

右侧的柱塞法使用一个简单的起动电磁阀；在下行程中，当吸头与膜之间的距离约为 1-2 mm 时，电磁阀会以很大的力压缩移液管。此方法以很大的力将全部样品从吸头中排出。人们认为，较大的力，尤其是在行程末端施加的力，有助于形成分离所需的条件。这一结论基于手动和自动化实验结果：在行程末端施加较大的力似乎可以防止发生结合。

实验使用 Pipetman P2移液器，样品量为 0.5 uL。溶液由 50% 水和 50% ε-己内酯组成。己内酯是一种溶剂，正如美国 专利号 *7,326,326* [1]中所述，它也是一种适当的润湿剂。 设备系统采用气动滑台，通过两个传感器控制其运动和位移。气动滑台启动后会向下和向上各运动一次，电磁阀或执行器会自动启动。通过传感器位置从宏观层面控制针尖与膜之间的距离，并通过千分尺台从微观层面进行控制。将疏水性聚偏二氟乙烯（PVDF）膜放置在点样表面上，并在点样过程中保持静止。点样完成后，立即将膜送往实验室进行电泳。首先将膜浸入低电导率缓冲溶液中，该溶液的 pH值可调。然后将膜放置在两块玻璃板之间，施加高电压约五分钟。随后断开电压，将膜取出，用水短暂清洗，并用水溶液中的活性棕染料染色[4]。整个过程耗时较短，约 40 分钟即可完成；相比之下，二维聚丙烯酰胺凝胶电泳法需要一至两天。

首先观察手动实验的结果，以确定蛋白质分离的最佳条件。高速摄像机记录了点样过程，观察实验人员的手部动作以及样品在表面上的点样情况。通过这些观察，便能够设计出一种可重复实现最佳参数的设备。图2展示了

一次手动实验所得的结果：其中，六种蛋白质的混合物根据各自的等电点实现了完全分离。位置1-10展示了蛋白质分离的情况。图中标出了极性，并显示了每种蛋白质对应的等电点。位置8为点样原点。缓冲溶液的pH值设为5。图2所示结果表明，这种新型电泳方法能够实现蛋白质的完全分离。



Position	Isoelectric Point	Protein
1	9.6	Cytochrome-C
2, 3, 4	8.6, 8.4, 8.2	Lentil Lectin
5, 6	7.2, 6.8	Myoglobin
7	5.1	Beta-Lactoglobulin
8	-	Origin
9	4.2	Glucose Oxidase
10	3.6	Amyloglucosidase

图2. 六种蛋白质混合物的手动点样

所提出的自动化方法采用已知为理想的手动点样技术参数。从这些实验中观察到，蛋白质往往会沿着原点集中成环形。人们认为，这种环状聚集会导致一定程度的结合，因此必须避免，才能获得良好的结果。

我们的初步结果表明，采用自动化方法时，蛋白质会沿膜表面发生一定程度的结合。我们的实验发现，减小接触面积和施力对于获得良好结果至关重要。

采用这种电泳方法进行蛋白质分离，高度依赖实验人员。施力大小以及吸头与膜之间的距离被认为是获得良好结果最关键的参数。要将这些理想参数推广并整合到自动化装置中并不容易，因为很难复制人工实验人员的操作。提出的两种自动化方法表明，只要考虑所有已知的理想参数，就有可能实现蛋白质分离。我们通过试验不同类型的膜，考察孔径、空腔结构和疏水性，以说明为何手动操作的结果如此依赖操作者。正是由于这种依赖性，自动化才是避免这一问题的唯一可行途径。我们希望改进自动化流程，使手动点样不再成为必要。这将使实验流程更加高效，并为该行业带来价值。

致谢

特别感谢　　Nanotechnology Institute（费城，宾夕法尼亚州）提供的资金支持。

参考文献

[1] Chang, F. 和 Yonan, C.（2008）年。 专利号 *7,326,326*。 美国。

[2] O'Farrell, P.（1975年）。蛋白质高分辨率二维电泳。《生物化学杂志》，4007-4021。[3] C. Altenfderfer、P. Hutapea（2009年）。用于蛋白质复合物分离的智能移液装置，数字对象标识符：10.13140/2.1.3927.3760。[4] Yonan, C.R.、Duong, P.T. 和 Chang, F.N.（2005年）。不同印迹膜上的蛋白质高效染色。《分析生物化学》338：159–161。