

密级:_____



中国科学院大学
University of Chinese Academy of Sciences

硕士学位论文

气相扩散型微流控芯片及其蛋白质结晶应用研究

作者姓名: _____ 王 丽 _____

指导教师: _____ 赵建龙 研究员 李刚 研究员 _____

_____ 中国科学院上海微系统与信息技术研究所 _____

学位类别: _____ 工程硕士 _____

学科专业: _____ 集成电路工程 _____

培养单位: _____ 中国科学院上海微系统与信息技术研究所 _____

二零一五 年 五 月

A Microfluidic Device for Screening Protein Crystallization
Conditions by Vapor Diffusion

By
Li Wang

A Dissertation Submitted to
University of Chinese Academy of Sciences
In partial fulfillment of the requirement
For the degree of
Master of Integrated Circuit Engineering

Shanghai Institute of Microsystem and Information
Technology

Chinese Academy of Sciences
May, 2015

致 谢

值此论文完成之际，谨向我的导师赵建龙研究员和李刚研究员致以由衷的敬意。衷心的感谢导师这三年来在学习和生活中对我的悉心指导。感谢赵老师和李老师在论文的选题、实验方法及论文撰写等各个方面给予的无私帮助和支持，从论文开题到完成都离不开老师的谆谆教诲。导师的严谨的科研态度、一丝不苟的治学风格、创新意识及敬业精神给我留下了深刻的印象，在这三年中，我从老师的身上学到了许多宝贵的经验，是我一生中不可多得的一笔财富。

感谢金庆辉研究员对我论文工作中给予的宝贵建议及生活上的诚挚关怀，感谢生物芯片实验室这三年来提供的优越的实验环境。

感谢陈强副研究员对我实验上的细心指导，有了陈老师的耐心细致的引导，才让我能很快的熟悉实验流程及实验室仪器操作，顺利的完成科研实验。

衷心的感谢实验室的工作人员王其旻、陈强、吴蕾、郭慧、毛红菊、葛玉卿、景凤香、贾春平、张宏莲、卞小军、赵辉、许宝建、张洹千等老师的对我工作的支持和帮助。

感谢已经毕业的朱壮辉师兄给予我的实验和生活上的帮助，感谢实验室的高坤鹏、蔡奇、王萍、杜晓薇、范晓云、肖小玉、李宫、孙浩、武振华、吴思敏、符亚云、刘莉芬、程祖乐等同学在生活工作上的交流和帮助，有了他们，我的研究生生活有了不一样的色彩和快乐。

在课程学习和论文工作期间，还要特别感谢研究生部的各位老师在生活、学习等方面给予的关怀和帮助。

感谢我的家人和朋友，他们对我无微不至的关怀和无怨无悔的支持，是我克服学习和生活中的各种困难的动力，感谢他们给予我的温暖和幸福。

最后衷心的感谢所有 给予我关心和帮助的老师、同学和朋友们！

致 谢.....	A
摘 要.....	I
ABSTRACT	III
第一章 绪论.....	1
1.1 引言	1
1.2 蛋白质结晶及其研究进展	2
1.2.1 蛋白质结晶历史	2
1.2.2 蛋白质结晶原理	3
1.2.3 传统的蛋白质结晶方法及发展现状	4
1.3 微流控技术应用于蛋白质结晶的研究	8
1.3.1 微流控芯片技术的优越性	8
1.3.2 典型的微流控蛋白质结晶芯片	11
1.4 本课题的研究思路	17
1.5 本章小结	18
第二章 气相扩散型蛋白质结晶芯片	19
2.1 引言	19
2.2 芯片设计	20
2.2.1 结构设计	20
2.2.2 工作原理	21
2.3 芯片制备	22
2.3.1 芯片的模具的制备	22
2.3.2 PDMS 芯片制备	23
2.4 芯片自动进样能力测试	24
2.4.1 自动进样实验步骤	24
2.4.2 自动进样实验结果与讨论	25
2.5 芯片脱水能力测试	26
2.5.1 脱水实验步骤	26
2.5.2 脱水实验结果与讨论	26
2.6 蛋白质结晶实验	28
2.6.1 蛋白质结晶实验步骤	28
2.6.2 蛋白质结晶实验结果与讨论	28
2.7 芯片上蛋白质结晶条件浓度优化	30
2.7.1 浓度优化实验步骤	30
2.7.2 浓度优化实验结果与讨论	31

2.8 本章小结.....	31
第三章 梯度气相扩散型蛋白质结晶芯片.....	33
3.1 引言.....	33
3.2 芯片设计及工艺制备.....	34
3.2.1 芯片设计原理.....	34
3.2.2 芯片结构设计.....	35
3.2.3 梯度气相扩散型芯片夹心式结构制作工艺.....	36
3.2.4 结构化 PDMS 薄膜的高效转移.....	38
3.3 芯片抗水分挥发能力测试.....	39
3.3.1 实验过程.....	39
3.3.2 实验结果与讨论.....	39
3.4 蛋白结晶实验.....	40
3.4.1 实验步骤.....	40
3.4.2 结果与讨论.....	40
3.5 梯度气相扩散型芯片用于蛋白质结晶优化.....	41
3.5.1 实验步骤.....	41
3.5.2 实验结果与讨论.....	42
3.6 本章小结.....	42
第四章 总结与展望.....	44
4.1 工作总结.....	44
4.2 论文创新.....	44
4.3 论文展望.....	45
参考文献.....	46
发表文章.....	50
已申请专利.....	51
作者简介.....	52
附件一.....	53

气相扩散型微流控芯片及其蛋白质结晶应用研究

王丽（集成电路工程）

指导老师：赵建龙 研究员

李刚 研究员

摘 要

蛋白质结晶是结构生物学研究的一个重要瓶颈，传统的蛋白质结晶方法在样品消耗量、蛋白质纯度、筛选可结晶条件和优化结晶条件等方面存在不足，微流控芯片能够降低样品消耗，提高结晶筛选的通量和效率，在实用性和经济性上具有得天独厚的优势。本文主要针对现有蛋白质结晶芯片的局限，研究了基于气相扩散结晶模式的微流控蛋白质结晶芯片，主要研究工作和结果如下：

1. 针对筛选出可结晶的条件和优化结晶条件等蛋白质结晶主要瓶颈，基于气相扩散结晶原理，分别设计了用于结晶条件筛选的气相扩散型蛋白质结晶芯片和用于结晶条件优化的梯度气相扩散型蛋白质结晶芯片，并利用 MEMS 微加工工艺完成了芯片的制备。

2. 为了评估用于结晶条件筛选的气相扩散型蛋白质结晶芯片的性能，本文首先以食品色素溶液为研究对象，验证了芯片上流体操控及气相扩散功能。然后以五种结晶模式蛋白为实验对象，进行了芯片上的蛋白质结晶条件筛选实验。实验结果证明该芯片可以利用离心力和毛细微阀作用力完成对样品溶液精确的自动进样控制，可实现基于气相扩散结晶模式的蛋白质结晶条件筛选。与传统的悬滴方法相比较，本文研制的用于蛋白质结晶筛选的气相扩散型蛋白质结晶芯片能够筛选出更多的结晶条件，而且对蛋白质样品的消耗量减少两个数量级。

3. 为了克服现有的 PDMS 微流控芯片存在的水分易挥发问题，本文发展了一种简便高效的“玻璃-PDMS 薄膜-玻璃”夹心式微流控芯片的制作方法，并以此设计制作了用于结晶优化的梯度气相扩散型蛋白质结晶芯片。为了评估梯度气相扩散型蛋白质结晶芯片在蛋白质结晶条件优化中的效果，利用溶菌酶做结晶条件优化实验，结果显示，与传统 PDMS-Glass 芯片相比，夹心式芯片可极大降低微流控芯片中溶剂的挥发

速率，梯度式气相扩散能对蛋白质的过饱和度进行优化调节，使其更容易形成优质单晶。

关键词：蛋白质结晶，微流控芯片，气相扩散，毛细管微阀，结晶条件优化，低溶剂挥发

A Microfluidic Device for Screening Protein Crystallization Conditions by Vapor Diffusion

Li Wang (Integrated Circuit Engineering)

Directed by: Prof. Jianlong Zhao

Prof. Gang Li

ABSTRACT

Protein crystallization is a major bottleneck of structural biology research, the conventional protein crystallization method exist some disadvantages in sample consumption, protein purity, screening crystallization conditions and optimize the crystallization conditions. Protein crystallization microfluidic chip is much more practical and economical than conventional crystallization methods, which can reduce sample consumption, improve throughput and efficiency of crystallization screening. In this paper, we have developed a microfluidic device for performing protein crystallization trials by vapor diffusion. The topics of this dissertation are presented below:

1. Focus on the main bottleneck of protein crystallization in screening crystallizable conditions and optimize the crystallization conditions, a novel microfluidic device to implement the vapor diffusion technique for screening crystallization conditions and a gradient vapor diffusion protein crystal chip for optimize the crystallization conditions were designed in this paper. Then the fabrication of the chip is finished by microfabrication technology.

2. To demonstrate the functionality of the vapor diffusion protein crystallization device, the capability to perform vapor diffusion crystallization and self-dispensing using the chip was tested with food dye. Then the practicability of the device was illustrated by applying it to protein crystallization, using five kinds of model protein. By combining the capillary effect and centrifugal force, this chip allows us to automatically and parallelly deliver multiple nanoliter protein solutions and precipitants to the reaction chambers for high-throughput crystallization screening. Furthermore, the design of two-level capillary stop valves and vapor-diffusion chambers in this device allows vapor transport between the protein droplet and the stored precipitant, perfectly equivalent to that observed in conventional vapor diffusion techniques. When applying this device to protein

crystallization, the results showed that crystallization experiments on the chip yielded slightly more hits than the conventional hang-drop technique, but also to reduce the consumption of protein samples two orders of magnitude.

3. In order to overcome the problem brought by the evaporation in protein crystallization microfluidic chip, a simple and highly effective fabrication method was developed to make “Glass-PDMS film-glass” sandwich structure microfluidic chip, and thus designed the gradient vapor diffusion protein crystal chip for optimize the crystallization conditions. Compared with conventional PDMS-Glass Chip, the sandwich chip can greatly reduce the solvent evaporation rate of the microfluidic chip. Meanwhile, the chip was applied to test the practicability in protein crystallization experiments, using the model protein of lysozyme. The result demonstrates that the supersaturation rate of protein can be optimized by the gradient vapor diffusion chip, and making it easier to form a high-quality single crystal.

Keywords: protein crystallization, microfluidic chip, vapor diffusion, capillary stop valves, optimization of crystallization conditions, low solvent evaporation

第一章 绪论

1.1 引言

随着人类基因组及其他一系列生物基因组测序的完成,各种已知基因的注释与确认已成为生命科学面临的最重要任务之一。基因组中绝大部分基因及其功能有待于在蛋白质水平上加以揭示与阐述,所以蛋白质科学与技术已经成为 21 世纪生命科学与生物技术的重要战略前沿,是生命科学突破与生物技术创新的关键领域^[1]。利用已有的基因组测序成果,大批量的克隆相关基因,并表达、纯化和结晶相应蛋白质,再结合 X 射线衍射和核磁共振等技术,揭示蛋白三维空间构象,理解蛋白质结构和功能的相互关系,阐明生物体内的相关生物学机制,对于我们了解生物体的生理变化机制及其与疾病的关系,以及指导药物设计等都有极其重要的意义^[2,3]。

目前测定蛋白质三维结构的方法主要有两种:核磁共振(Nuclear Magnetic Resonance, NMR)方法和 X 射线衍射法。NMR 方法虽然可以研究蛋白质的动态过程,如小分子与蛋白质结合对其结构的影响,但由于 NMR 方法目前只能分析大小不超过 30 kD 的小蛋白(国际生物大分子结构数据库 PDB 中由 NMR 解析的蛋白质平均大小约为 9 kD),并且需要长时间人工解析,误差较大,因此该方法在应用上存在较大的局限性^[4]。而与 NMR 方法相比, X 射线衍射法具有更高的分辨率,可用于大的蛋白质分子(甚至病毒和核糖体)三维结构解析,因此成为目前蛋白质精细结构测定的主要方法(截至 2009 年 12 月 30 日国际生物大分子结构数据库 PDB 中 86.2%的蛋白质结构数据由 X 射线衍射方法获得)。但是对于 X 射线衍射方法来说,其成功运用的前提条件是必须有足够大的优质单晶体。然而,由于蛋白质结晶是一个非常复杂的热力学动力学过程,对外部条件非常敏感,且现有技术无法预先推测其最优结晶条件,因此对结构生物学家来说获得一个适于 X 射线衍射的蛋白质晶体是一件非常困难和艰辛的任务,往往要耗时几周甚至一年,大多数情况下甚至是徒劳无功,仅仅得到一些失败的结果,比如无定形沉淀、众多的微晶、孪晶、多个晶体的融合体,或有缺陷的单晶体等。显然,目前蛋白质结晶已成为制约结构生物学发展的一个主要瓶颈^[5]。

1.2 蛋白质结晶及其研究进展

1.2.1 蛋白质结晶历史

蛋白质晶体生长的历史最早可以追述到 160 年前^[6,7]。1840 年, Hünefeld 首次报道了第一个蛋白质晶体-血红蛋白晶体 (hemoglobin protein crystal), 这个晶体是将从蚯蚓血液中获得血红蛋白夹在两片玻璃片之间使其缓慢蒸发浓缩而获得的。这篇报道表明, 蛋白质晶体可以利用缓慢的蒸发失水获得, 这也就是目前所用的蛋白质结晶技术的基础。随后, 研究者关于蛋白质结晶的研究主要集中在不同动物物种的血红蛋白上, 但是, 直到 1850 年, 所有关于血红蛋白晶体生长的报道都称其为偶然获得的, 并没有研究者提出任何能够引导血红蛋白晶体生长的方法。第一个成功设计出可重复性获得血红蛋白晶体方法的人是 O.Funke, 他在之后的两年期间发表了一系列有关血红蛋白晶体的文章, 还进行了一系列有关人, 马、狗、鱼等血红蛋白晶体体外结晶条件的实验。

1850 年到 1900 年左右, 从植物体内提出的蛋白受到了人们的关注, 主要对植物种子中的“球蛋白”进行了研究。1855 年, Harting 发表了一系列详细介绍植物种子中蛋白质晶体观察的文章, 1858 年到 1859 年, Maschke 成功提取了巴西果蛋白, 并将其进行了结晶。该时期用于获得蛋白质晶体的方法主要是: 首先将提取的蛋白质放入盐溶液中, 然后对溶液进行缓慢的降温处理, 在蒸馏水中对盐溶液进行彻底透析, 最后用酒精、丙酮等有机溶剂处理蛋白质盐溶液^[8]。其中, 在恒定的溶液环境下进行温度变化, 低离子强度溶液中进行透析, 利用有机溶剂作为结晶沉淀剂在现在的蛋白质结晶方法中依然经常使用。几乎在植物种子蛋白研究的同时, 人们对两种动物的蛋白鸡蛋白蛋白和马血清蛋白的结晶行为也进行了研究, 直到 1898 年, Hopkins 和 Pinkus 才对其明确的晶体生长过程进行了报道, 该方法用了 Hofmeister 利用高浓度的盐离子溶液对蛋白质进行盐析的理论, 并通过调节 PH 值获得蛋白质晶体。1926 年 Sumner 成功的将第一个酶, 脲酶用 30%的丙酮在低温下进行了结晶^[9], 随后, Abel 等人成功的将第一个激素, 胰岛素进行了结晶, 并且第一次将二价金属离子引入蛋白质晶体。

直到 20 世纪 30 年代末期, 一些 X-射线衍射专家将注意力转向蛋白质晶体上来以得到蛋白质结构信息, 为蛋白质、核酸等晶体生长提供了巨大的驱动力, X-射线衍射技术的参与也对结构生物学产生了深远的影响。1930 年到 1960 年, X-射线衍射专家们对大量的生物大分子晶体进行了衍射分析, 但是到 20 世纪 70 年代中期, 随着数据收集、计算机技术以及生物医药学技术的快速发展, 现有的蛋白质晶体已经不能满足研究的需求。当然, 如何获得适合 X 射线衍射研究的晶体又成了一个重要的问题, 尽管蛋白质晶体生长有了很长的研究历史, 但是到目前为止, 大多数实验室仍然主要采用“试错”的方法进行蛋白质晶体生长, 很难有一个具有指导意义的晶体生长程序。

1.2.2 蛋白质结晶原理

蛋白质结晶学是 19 世纪下半叶发展起来的一门科学，蛋白质结晶即蛋白质分子从过饱和的溶液中析出形成晶体。结晶的过程是蛋白质分子相变的过程，分为晶核形成和晶体生长两个阶段。在蛋白质晶核形成的过程中，溶液中蛋白质的浓度逐渐降低，推动结晶体系由亚稳态区域向稳定区域转变，进入稳定区域后，晶体逐渐长大，而晶核的数量不再增加。图 1.1^[10]所示的简化相图绘制的蛋白质在沉淀剂中的溶解度曲线，展示了蛋白质溶液在不同的沉淀剂环境下能否获得蛋白质晶体。

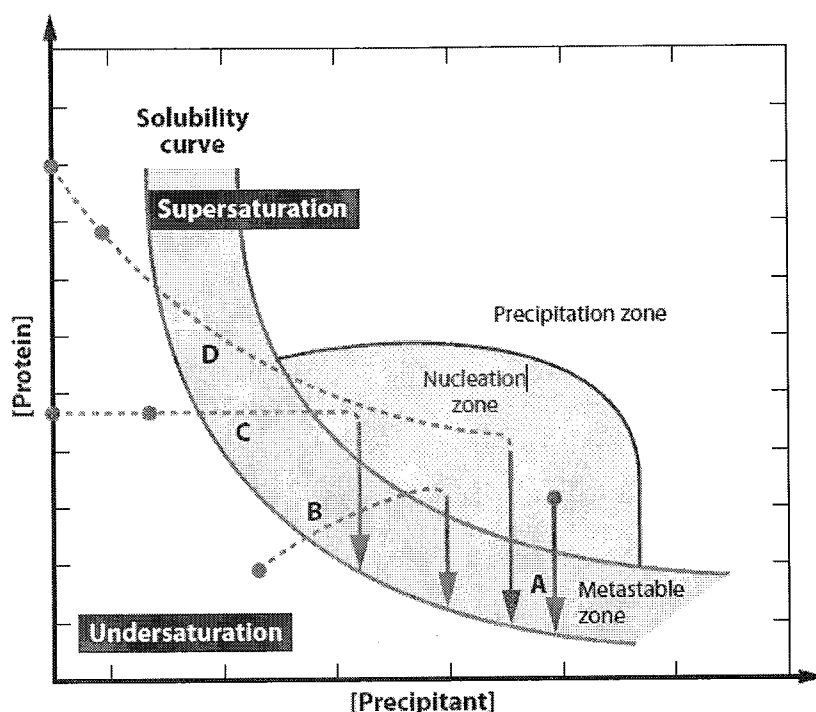


图 1.1 简化的蛋白质结晶相图

在该图中，仅用蛋白质浓度和沉淀剂浓度作为结晶条件描述的参数，而在实际结晶环境中，还必须考虑蛋白质纯度、pH 值、温度、离子强度、缓冲液的类型等许多其他因素，此时相图也会扩充到相应的维度和不连续区域。如图 1.1 所示，在蛋白质溶液的过饱和空间内有成核区、沉淀区和亚稳态区三个空间区域。在蛋白质成核区，蛋白质溶液的浓度足够高，使晶核自发形成并达到可以支持后续晶体生长的临界尺寸；在沉淀区，由于蛋白质的浓度过高，使得蛋白质晶体成核和生长的速率过快，容易形成大量的微晶和沉淀物；在亚稳态区，蛋白质浓度过低，使得溶液体系内不会再有晶核形成，而已经存在的蛋白质晶体则继续生长。由于动力学在蛋白质结晶过程中起到至关重要的作用，使得结晶相图中各个区域的界限并不明确。例如，在相同的结晶条件下，数秒的时间可能导致蛋白质溶液中出现成核现象，潜伏期过长又可能会导致沉淀的产生，从而不能获得蛋白质晶体。蛋白质结晶实验的化学空间是多维的，而且不

同的区域空间会使得蛋白质的成核和生长过程发生变化,以致形成不同的晶体形状和多晶核结构。然而,结晶相图依然可以再针对特定蛋白质的结晶条件筛选中起到指导作用^[11]。

1.2.3 传统的蛋白质结晶方法及发展现状

要想获得高质量的蛋白质晶体一般需要克服:得到高纯度、均一的蛋白质样品,筛选可结晶条件,优化结晶条件 3 个难题,其中,筛选出可结晶的条件是得到蛋白质晶体的主要瓶颈之一,所以提高蛋白质结晶条件的筛选成功率是 X 射线衍射结构解析技术首先要解决的问题。但是,随着各方面技术的成熟,自动化程度的提高,在蛋白质结晶条件筛选方面也取得了很大的进步,目前培养蛋白质结晶的传统方法主要有油下结晶法(Microbatch)、气相扩散法(Vapor diffusion)、透析结晶法(Dialysis)和自由界面扩散法(Free interface diffusion)^[12, 13]。

(1) 油下结晶法

油下结晶法^[14, 15](也称批量结晶法, Microbatch)是一种简单古老的的结晶技术,它是在封闭的溶液体系环境下,直接将蛋白质溶液和沉淀剂混合来实现结晶。油下方法是基于发现相图上能够出现晶体的起始点。该起点必须在成核区内,如图 1.1 中路线 A 所示。将微量的蛋白质溶液和沉淀剂混合后,蛋白质就开始出现过饱和,并且混合液滴的结晶条件仅随着溶液内蛋白质溶液的浓度变化而变化。当该条件出现时,晶核就会形成,晶体开始生长。随着晶体的生长,液滴内蛋白质的浓度开始迅速下降,一旦到达亚稳态区,就不会再有新的晶核产生,但是已经存在的蛋白质晶体继续生长直到液滴内溶解的蛋白质溶液消耗殆尽。

这种方法的关键是控制所加的沉淀剂的量,以使蛋白质溶液逐步达到低过饱和状态。但是传统的批量结晶法对蛋白质样品消耗量大,所用体积一般在 50 μ L 到几毫升之间,不符合筛选微量蛋白质的结晶条件。Chayen 最早提出了微批量结晶法,即微池法,使用低密度的石蜡油密封结晶液池,虽然不能实现完全密封,但可以阻止沉淀剂的大量快速蒸发,这种方法所需溶液量很少,一般为 1~2 μ L。为了进一步提高 Microbatch 技术的筛选成功率,研究者对该技术进行了一系列改进。Talreja 和 Khurshid 先后设计了两套通过控制结晶液池气体交换速率的装置来提高 Microbatch 的筛选成功率^[16, 17],见图 1.2(其中①表示混合后的蛋白质和盐溶液,②表示连接外界环境和结晶液池的毛细管)。目前微池法中液滴的不同组分可以通过与计算机联用的微分布器实现自动调节,节省了大量的手工操作,而且能够精确控制结晶条件。

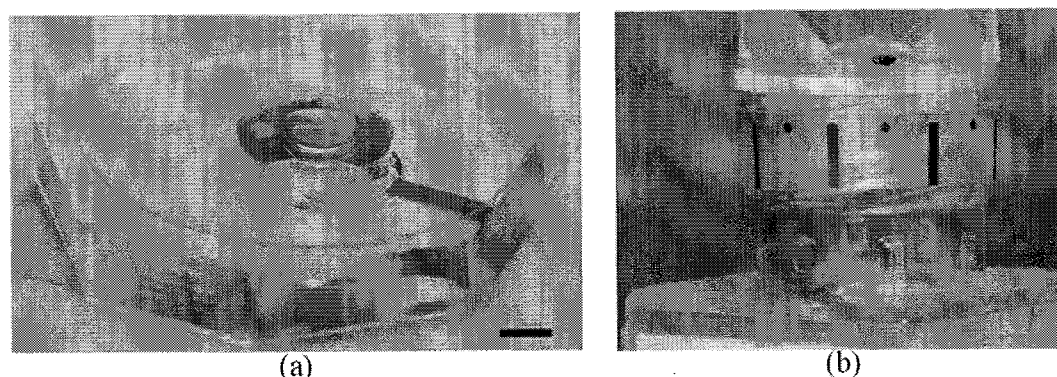


图 1.2 两套控制蛋白质过饱和速率 Microbatch 的装置：(a) Talreja 设计的通过控制毛细管的侧面积与长度的比例来量化控制气体的扩散速度；(b) Khurshid 设计的通过控制结晶容器盖的旋转角度来量化控制气体的扩散速度

(2) 气相扩散法

气相扩散法^[18]是指将蛋白质结晶所需要的盐溶液与略低于该盐溶液浓度的蛋白质溶液封闭在一个体系内,盐溶液与蛋白质溶液之间存在一定的浓度差,在浓度差的作用下水分子蒸发扩散,由低浓度的蛋白质溶液扩散到高浓度的盐溶液中,最后达到平衡,蛋白质溶液中盐浓度增加而蛋白质溶解度降低,达到过饱和而结晶。在气相扩散结晶法中,结晶试验开始于欠饱和区域的一个点,随着水分子的蒸发扩散,液滴中蛋白质和沉淀剂的浓度增加,如图 1.1 中路径 B 所示,一旦路径到达成核区,液滴中形成晶核,蛋白质晶体开始生长。随后液滴内蛋白质浓度降低,进入与批量结晶法相似的晶体生长阶段。

此法不但可节省样品而且可有效利用储存空间,晶体生长的基本装置是 Linbro 多孔组织培养板及用二甲基二氯硅烷硅化后的玻片或塑料盖玻片。气相扩散法主要包括悬滴法和坐滴法。它们之间的区别就在于蛋白质溶液在容器中的位置不同,如图 1.3 所示。

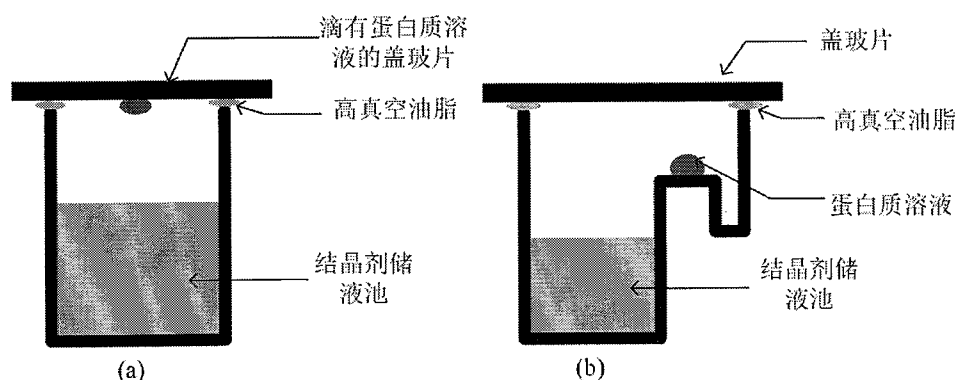


图 1.3 气相扩散法两种装置示意图 (a) 悬滴法 (b) 坐滴法

悬滴法中，蛋白质溶液（红色）悬于样品池溶液上方的玻片上，实验时首先在组织培养板的孔中加入 0.2-0.5mL 经过超滤的含沉淀剂及添加剂的缓冲液，作为池液，

孔边缘涂上真空脂；然后吸取 1 μ L 或 2 μ L 池液放到硅化后的盖玻片上，加等体积蛋白溶液至此池液上（这个体积比将决定平衡后的蛋白质浓度），混合均匀，应避免气泡出现，翻转盖玻片盖在孔上，检查密封是否良好。与悬滴法相反，坐滴法中蛋白质溶液（红色）位于样品池溶液（蓝色）上方的底座上，坐滴中含池液和蛋白溶液各 1-2 μ L。在即使使用非离子去垢剂作为添加剂表面张力较低时、或用聚乙二醇或乙醇作为沉淀剂（由于凝结等问题，悬滴体积趋于增大）时、反向扩散导致液滴增大时、或结晶条件已确定，需要大量晶体时此方法非常适用。传统生物实验室中最常用的是悬滴法，而坐滴法更有利于蛋白质结晶情况的自动监测，这两种方法原理相同，都需要密封容器。气相扩散法是目前应用最广泛的蛋白质结晶技术，但是在结晶过程中也存在着对液滴体积和精确化学成分的不可控制性、离子挥发导致的 PH 值变化和温度变化导致的晶体溶解等问题，需要进行进一步改进。

（3）透析结晶法

透析结晶法^[19, 20]是蛋白质分子与沉淀剂中间用半透膜隔开，膜两侧存在一定的浓度差，使得小分子的沉淀剂通过半透膜与大分子蛋白质混合，而大分子蛋白质不能通过半透膜，从而使膜内沉淀剂的浓度逐渐增加，而蛋白质溶液浓度不变，如图 1.1 中路线 C 所示。一旦路径到达成核区，蛋白质晶核产生，蛋白质晶体开始形成。

1996 年，Landau^[21]提出了用脂质立体中间相作介质来提高膜蛋白的可结晶性，但是这种膜的粘性较强，不易操作。随后，Faham^[22]等发明了 Bicell 膜，这种膜是由去垢剂和脂质形成的双分子层，低温下处于液体状态，温度达到一定高度时就变为粘性较强的胶状固体。Bicell 膜不仅可以为蛋白质提供疏水性环境，而且从双分子层中收获晶体也变得简单易行。透析结晶法的优点是可以改变结晶条件以控制扩散速率，从而慢慢达到成核结晶点，缺点是限制了某些沉淀剂的使用，如 PEG 等。

（4）自由界面扩散法

自由界面扩散法^[23]即液-液扩散法，是在毛细管两端分别加入蛋白质溶液和沉淀剂，由于两者之间存在浓度差，蛋白质溶液和沉淀剂不断向中间扩散，最后在交汇处形成自由界面。在自由界面处，蛋白质溶液向沉淀剂一侧扩散，而沉淀剂向蛋白质溶液一侧扩散，使得蛋白质溶液中沉淀剂的浓度逐渐增加而蛋白质溶液浓度降低，如图 1.1 中路径 D 所示，当路径达到成核区后，蛋白质溶液中晶核产生，随后生长出蛋白质晶体。这种方法对蛋白质的需求量较大（约 10 μ L），不可能精确控制液体的扩散速度，因此并未得到广泛利用。后来，人们在传统液-液扩散方法的基础上发展了逆向扩散法，主要是将蛋白质溶液装在毛细管中后，将毛细管放置在覆盖有沉淀剂的胶体介质中，在浓度差的作用下，沉淀剂通过胶体介质不断扩散，使蛋白质溶液达到过饱和而结晶。逆向扩散法的结晶相图如图 1.4 所示：

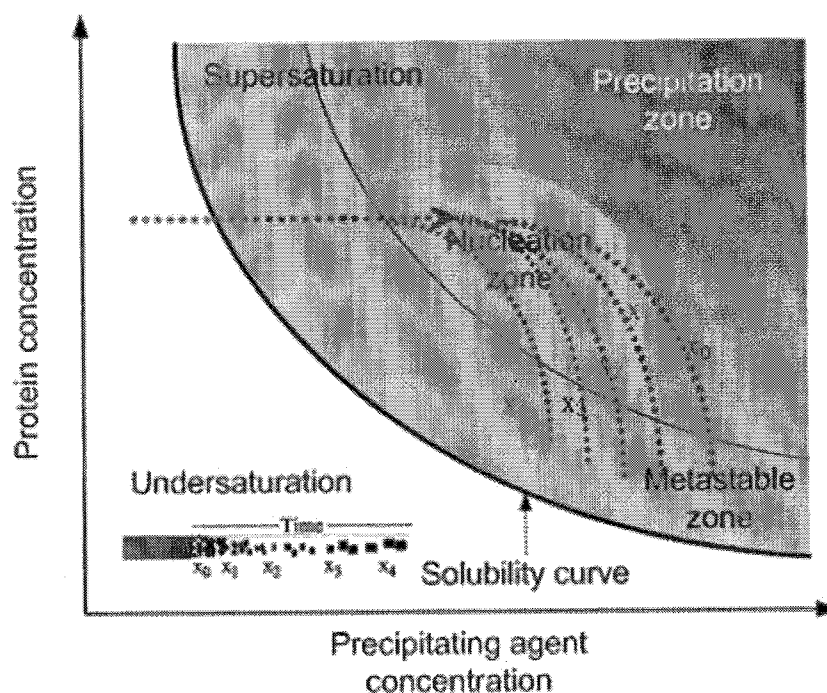


图 1.4 逆向扩散结晶法结晶相图

与传统液-液结晶方法相比，逆向扩散法在单个毛细管中自动形成从溶解区、亚稳态区、成核区到沉淀区一系列不同的浓度梯度，仅需要一次实验就可以在不同浓度下筛选可结晶的条件^[24]。图 1.5 是 Garcia-Ruiz 发明的一种利用琼脂糖作为介质的逆向扩散筛选装置^[25]（Granada crystallization box, GCB）。他们分别用溶菌酶、胰岛素和甜味蛋白质做结晶实验，比较悬滴法、坐滴法和逆向扩散结晶法的筛选成功率。结果表明，逆向扩散结晶法可以使蛋白质结晶筛选成功率提高 2 倍，改进后的 GCB 更是增加了精密的温度控制系统，最大限度排除了人为干扰，更加经济实用^[26]。

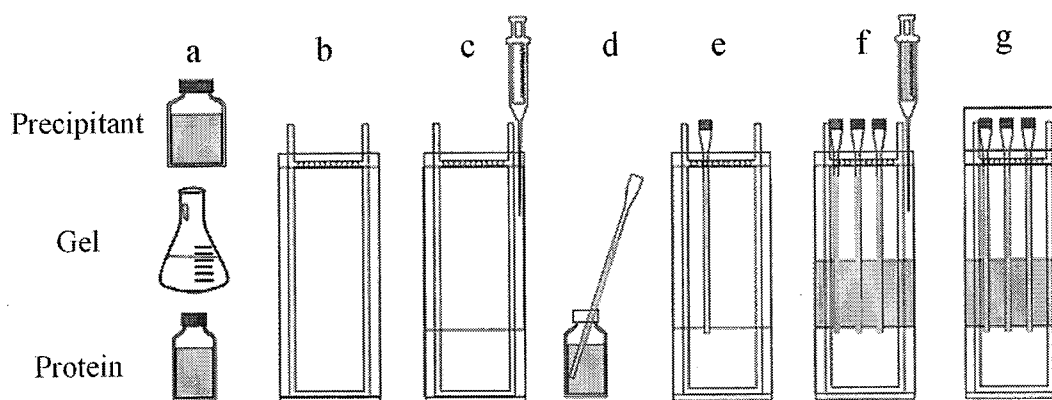


图 1.5 以琼脂糖为介质的逆向扩散筛选装置，GCB

上述四种结晶方法各有利弊，实际应用中主要依据蛋白质的种类、结晶要求等来选择合适的方法。气相扩散方法和批量结晶方法相对其他而言简单易行，已经实现了自动化。但是传统的蛋白质结晶技术存在样品成功率较低、技术繁琐、灵敏度不高等局

限,大大限制了结构生物学的速度。

为了改进传统结晶技术,降低蛋白质结晶条件筛选中样品消耗量,人们相继开展了仪器微型化研究,推出了高通量蛋白质结晶筛选机器人,如英国 Douglas 公司研制的 Oryx-nano 系列结晶机器人、TTP LabTech 公司研制的 Mosquito 系列机器人和美国 ArtRobbins 公司研制的 Phoenix 机器人等^[27-29],这些装置大多都是利用机械手控制的微量分液器来实现高通量的微量液样自动化定量分配,单个条件筛选所需要的蛋白质样品量为 50~200nL,与常规筛选方法相比降低了 20~100 倍,同时也有效减少了人力资源和研究成本、时间。最近微流体技术的发展也为蛋白质结晶条件的高通量、快速筛选提供了一个新的平台,比如 Fluidigm 公司的 TOPAZ 系统和 Dolomite 与 Emerald BioSystems 两公司合作推出的 MPCs 系统,均采用微流控芯片结合压力泵实现蛋白质结晶条件高通量自动化筛选,相比于基于机械手的自动化结晶筛选装置,微流体结晶系统可以用更少的蛋白样品和试剂进行高通量蛋白质结晶条件筛选,大大降低了蛋白质结构研究的费用。上述蛋白质结晶仪器,无论是机械手设备还是微流体系统都显示了较好的自动化性能,但是在实际使用中仍然存在很大的局限性:首先这些自动化的操作系统结构复杂,价格昂贵(数十万甚至上百万美元),普通结构生物学实验室难以承受,普及性较差;其次这些设备基本都是针对大规模、高通量结晶形式设计的,不能应用于普通实验室的小规模、中通量筛选,灵活性较差;再者,虽然这些设备进一步提高了蛋白质结晶实验操作的自动化程度,但是在获取优质结晶效率方面仍然不能令人满意。对于一些难以纯化表达的珍稀蛋白,膜蛋白等,该机器人系统的样品消耗量依然过高,难以满足结构生物学的需要。而进一步降低蛋白质结晶条件筛选中样品消耗量,提高筛选效率的难点在于随着液体体积的减少,液体比表面积增加,蒸发效应显著增加,在常规实验室条件下,一个皮升体积的液滴在几秒内即可完全挥发,生物分子在界面上的非特异性吸附或分子自组装容易引起分子失活、损失以及交叉污染^[30,31],从而使筛选结果出现假阳性或者假阴性。目前蛋白质结晶条件的筛选研究依然具有很大的难度,在探讨蛋白质可结晶性的研究中,发展更加高效、便捷、实用的方法依然是蛋白质结晶条件筛选研究的主要发展方向。

1.3 微流控技术应用于蛋白质结晶的研究

1.3.1 微流控芯片技术的优越性

由于蛋白质结晶过程的复杂性,目前还没有一种方法和技术可以预先推测获得最优蛋白质晶体的条件,仍然需要依靠大量试验区筛选合适的结晶条件。但是,影响蛋白质结晶的因素有很多,例如温度、PH 值、离子强度、盐溶液浓度等,在试验的过程中需要不断对以上各种因素进行优化,因此获得高质量蛋白质晶体所需要做的试

验次数是非常庞大的^[32], 因此对蛋白质的样品量、人力资源和时间消耗量巨大, 利用常规的蛋白质结晶方法不可能对全部的试验条件都进行尝试, 限制了许多蛋白质的结晶和结构解析。而现有的基于机器手控制的微量分液器实现了高通量的自动化操作, 节省了人力资源, 但是自动化操作系统价格昂贵, 一般实验室难以承受, 另外, 由于不同样品的黏滞性存在差异, 使得自动分液器取得的液体样品的体积难以精确控制, 无法保证结晶条件的重复性和一致性^[28]。微流控技术的发展为上述问题提供了解决方案, 微流控芯片技术是基于液-液扩散结晶法兴起的新的结晶技术, 在蛋白质结晶条件筛选和优化方面展示了良好的应用前景, 在微流控技术发展的早期就出现了在芯片上进行蛋白质结晶的成功案例。由于早期的微流控芯片多采用硬质的半导体硅材料, 在加工技术和流体驱动方法上均受到较大限制, 因此相关研究进展缓慢。

近年来, 微流控芯片技术的迅速发展, 采用基于聚二甲基硅氧烷(PDMS) 薄膜的微阀(Valve)技术、液滴(Droplet)技术和滑动芯片(SlipChip)的微流控系统在蛋白质结晶及其筛选研究中的应用取得了快速发展, 为蛋白质结晶条件筛选和优化提供了一个重要的技术平台^[11]。

(1) PDMS 微阀(Valve-based)技术

在 PDMS 微阀技术^[33]中, 蛋白质溶液和沉淀剂被加载到被微阀隔离的两个封闭腔室内, 开启微阀, 可以使两个腔室连通, 并在微通道内形成两个溶液的界面, 通过界面发生蛋白质和沉淀剂的自由扩散, 形成蛋白质晶体。每种沉淀剂和蛋白质的混合都由独立的阀门结构控制, 在图 1.6 (a) ^[34]所示的系统中, 通过设计平行的通道结构和不同的腔室尺寸, 单块芯片可以同时筛选 48 种不同的沉淀剂, 每种沉淀剂以三总不同的比例混合, 这样整个芯片可以同时实现 144 个不同浓度配比和混合速率的蛋白质结晶条件筛选试验, 从而可以实现对蛋白质样品结晶条件的高通量筛选, 以获得合适的蛋白质结晶条件。基于上述技术, Fluidigm 公司已开发了第一款商业化基于微流控技术的蛋白质结晶微系统—TOPAZ 系统。不过该技术需要大量的控制微阀, 系统的复杂程度较高。

(2) 液滴(Droplet-based)技术

在以液滴技术为基础的结晶系统^[35]中, 一相流体被与其不相溶的另一相流体隔离形成非连续的液滴, 每个液滴均可视为独立的微反应器。目前应用于蛋白质结晶的微流控液滴系统主要分为连续液滴技术、液滴装载器技术以及液滴实验室技术。如图 1.6 (b) 是 Ismagilov 等利用 T 型通道设计的连续流液滴芯片系统^[36, 37], 单次实验中, 通过调节水相分支通道中各溶液的相对流速, 可以改变液滴反应器中蛋白质和沉淀剂的相对浓度, 产生数以百计的液滴, 每个液滴即可对应不同的结晶条件。因此液滴系统特别适用于蛋白质结晶条件的初步筛选及优化过程。

(3) 滑动芯片(SlipChip)技术

滑动芯片^[38]最初主要由具有微结构的上下两块玻璃基片组成, 上层基片的微通

道结构用于引入蛋白质溶液，下层基片的微孔用于存储待测沉淀剂液滴。实验中，通过滑动上下基片，使得上层基片上的蛋白质溶液分别与下层基片微孔中的沉淀剂混合形成微反应器，整个实验操作需要在油相下进行，如图 1.6 (c) 所示。在滑动芯片技术中，由于蛋白质溶液和沉淀剂的相对体积是通过下层基片上的微孔的尺寸决定的，因此可以通过改变预装载沉淀剂的体积及微孔的尺寸来进行蛋白质与沉淀剂配比的结晶条件优化实验。

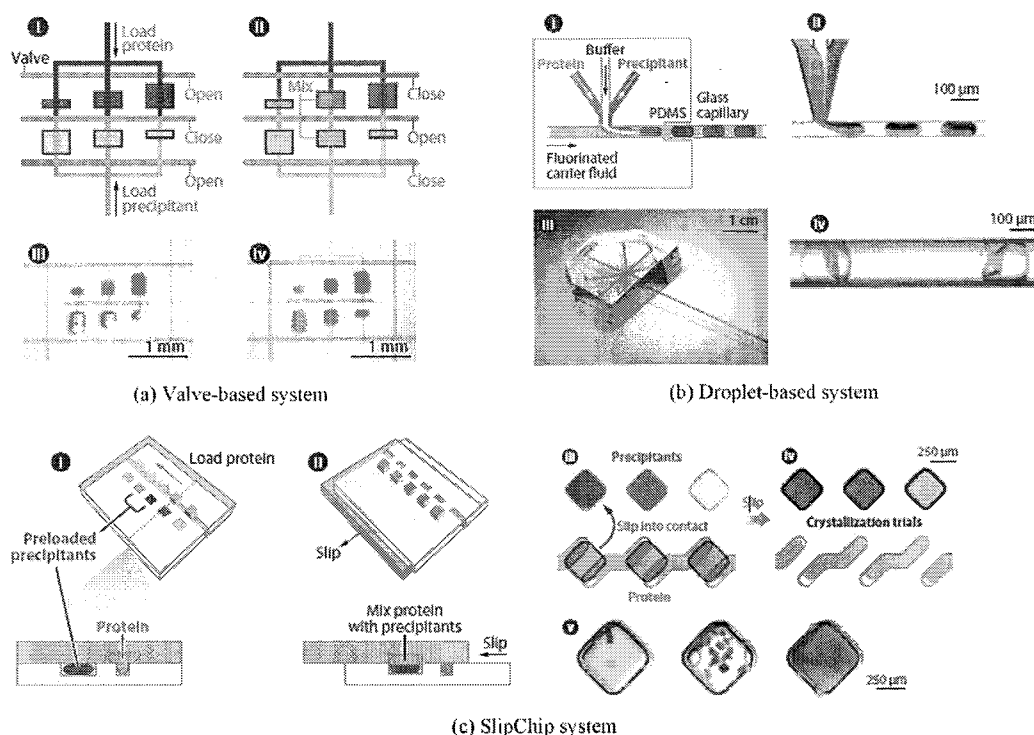


图 1.6 几种应用于蛋白质结晶的微流控芯片技术

以上三种微流控芯片技术在减少试剂消耗和提高筛选通量方面都取得了显著的进步，但是微阀技术和液滴技术均需要额外的液体驱动配件，使得设备较为复杂昂贵，与 PDMS 微阀技术和液滴技术相比，滑动芯片技术不需要泵阀驱动，操作简单，符合微流控蛋白质结晶技术微型化便携化发展的趋势，但是沉淀剂预装载操作复杂且费时，有待进一步提高。

无论是在结晶条件筛选，试剂消耗量还是操作流程方面，微流控芯片的特点使得微流控技术在蛋白质结晶条件筛选领域都有很多明显的优势。首先，微流控蛋白质结晶芯片能够减少单个条件试验所消耗的样品量，传统的蛋白质结晶方法蛋白质结晶试验单个条件蛋白消耗量为 μL 级，而微流控芯片的蛋白消耗量降低在几个 nL ，从而使珍稀蛋白的结构生物学研究成为可能。其次，微流控芯片能够控制通道中蛋白质样品，结晶试剂和盐溶液的比例，来筛选不同配比的溶液以达到不同的过饱和度，连续调节可结晶条件的浓度范围。微流控技术具有的通道网络大规模集成和液体操纵自动化的特点也大幅度减少重复劳动，节省大量的人力、物力和财力，而且微流控芯片高通量

的特点也为结晶条件筛选提供了极大的便利性,能够引入更多的蛋白质结晶的影响因素,增加条件试验总数,使液体更加均匀。最后,由于微流控芯片中反应腔的体积较小,使用的液体体积微小,蒸发扩散的速度也相应的增加,加快了平衡过程,加快试验反应速度,更快的得到蛋白质晶体,获得好的结晶条件。而由于结晶时间缩短,还可以减少因聚合、氧化、变性等引起的蛋白质分解的程度。

另外,微流控芯片提供的微尺度环境,使其具有极小的 Grashof 数(Grashof 数是表征扣题对流的无量纲常数,Grashof 数越小则流体对流越小)。研究显示,在蛋白质结晶过程中,由于重力场作用引起的液体对流传输是影响形成优质单晶的重要因素,其会扰乱结晶过程中晶体和溶液体系的浓度分布,从而影响蛋白质结晶成核与晶体成长。而微流控芯片的微尺度环境中自然对流几乎可以忽略,给蛋白质结晶提供了一个非常有利的动力学环境^[39]。同时微流控芯片操作简单易行,微流控芯片上进行蛋白质结晶条件筛选的这些特点使其越来越受到结构生物学家的关注。

1.3.2 典型的微流控蛋白质结晶芯片

鉴于微流控芯片技术在蛋白质结晶领域不可比拟的优势,目前研究人员开始将微流控技术用于构建蛋白质结晶条件筛选平台。根据蛋白质结晶的传统方法和原理,现有的微流控蛋白质结晶芯片主要分为以下两种:基于油下结晶的微流控蛋白结晶芯片、基于自由界面扩散的微流控结晶芯片、基于平衡透析结晶的微流控结晶芯片和基于蒸发扩散结晶的微流控结晶芯片^[40]。

(1) 基于油下结晶的微流控蛋白质结晶芯片

为了将传统的批量结晶法和微流控芯片技术相结合,芝加哥大学的 Ismagilov^[35, 41, 42]等人提出了基于油下结晶原理的微流控蛋白质结晶技术。该研究小组以微流控连续流液滴技术为基础,利用 PDMS、玻璃制作基于两相流的复合式微流控芯片。该芯片主要包括一个油相进样管道,一个水相进样管道以及一个液滴流出管道,其中水相管道分为蛋白质、沉淀剂和缓冲液三个管道。实验中,将含有蛋白质溶液、沉淀剂和缓冲液各自加入芯片的水相进样管道,在水相和油相管道的交叉处,水相溶液混合,在油相介质剪切作用下被分割成独立的微液滴,在油相的驱动下顺序进入到毛细管中,形成了“水溶液-有机混合溶液-水溶液”的多向间隔流。当毛细管中充满液滴后,将 PDMS 芯片与毛细管分离,用石蜡油密封毛细管的两端,根据批量结晶法的原理,密封在毛细管中混合液滴中蛋白质溶液的浓度逐渐降低,经过长时间的孵育最后形成蛋白质晶体,如图 1.7 所示。

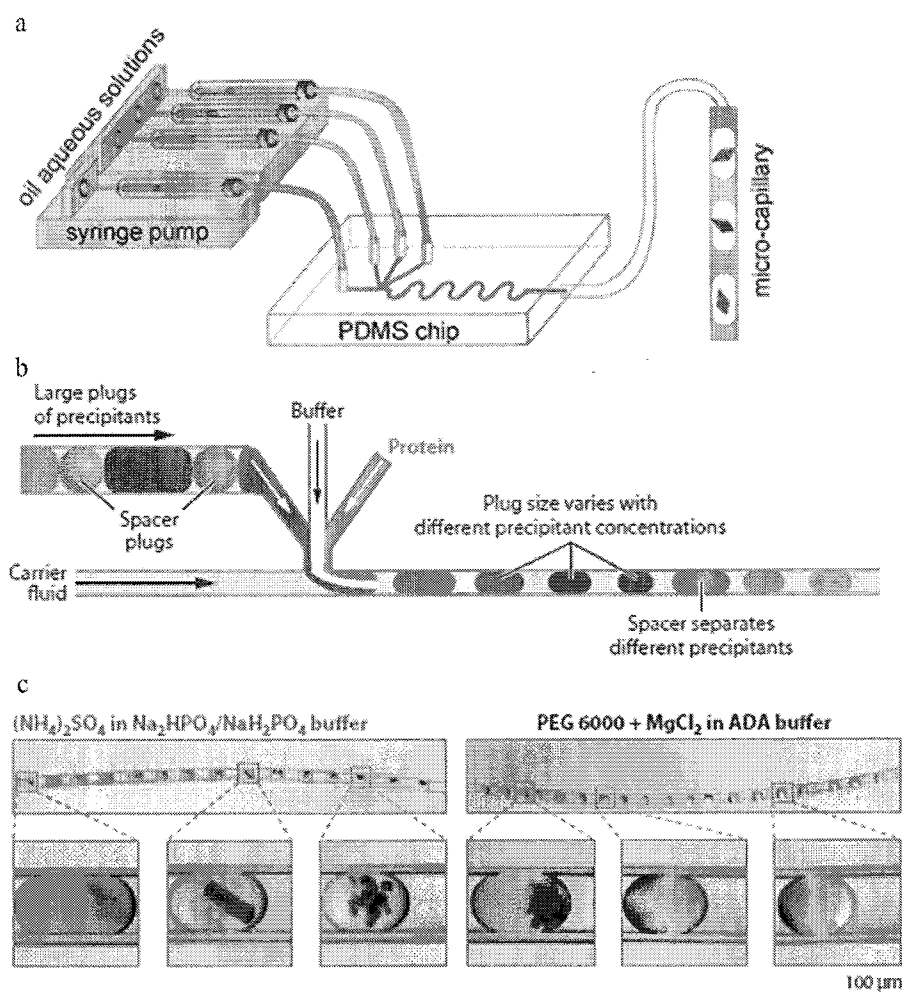


图 1.7 基于油下结晶的微流控蛋白质结晶芯片

该油下结晶的微流控蛋白结晶芯片中各类样品的流速可以通过注射泵(图 1.7 a)进行有效的控制,芯片能够快速形成沉淀剂和蛋白质溶液不同配比的反应液滴,每个液滴就是一种不同的结晶条件。有研究者利用该芯片进行蛋白质结晶条件筛选实验,仅用 20min 就完成了大约 1300 个结晶条件的进样筛选,蛋白质的消耗量为 $10\mu\text{L}$ 。为了防止 PDMS 通透性对结晶结果的影响,形成的液滴最后导入玻璃材质的毛细管中进行油下结晶,大量的液滴的形成就是蛋白质结晶条件的高通量筛选过程。该芯片技术的突出优点在于蛋白质结晶过程最终是在毛细管中完成的,生成的蛋白质结晶晶体不需要再做任何处理,可以直接在毛细管中进行原位 X 射线衍射分析,避免了在冷冻处理脆弱的蛋白质晶体时对其产生的潜在的破坏。不过这项技术是利用控制流速的方法改变液滴中成分的配比,对仪器的设备要求较高,但是注射器驱动力对微泵的推进速度具有一定滞后性,因此利用普通的微泵和注射器调节液体的流速无法实现对样品液滴配比的精确控制。

2010 年, Li^[43]等研制了一种基于离心力驱动的磁盘型微流控芯片用于蛋白质油下结晶,将蛋白质、沉淀剂和石蜡油分别加入对应的进样口后,在毛细管作用力和毛

细微阀的作用下,蛋白质和沉淀剂自动进入各自管道,并在微管道与反应腔的连接处自动停止。然后将芯片放到离心机上,在离心力作用下蛋白质和沉淀剂进入到反应腔中,并被石蜡油密封在反应腔内,形成密闭空间。单块芯片可以实现 24 种不同沉淀剂的筛选,每个反应腔的体积为 31nL,蛋白质的总消耗量为 360nL。

(2) 基于自由界面扩散的微流控结晶芯片

自由界面扩散(FID)是一种有效的蛋白质结晶方法,该方法的优点是单次实验即可以实现大量浓度条件的筛选,获得最佳的沉淀剂浓度。但常规的 FID 方法存在蛋白质溶液消耗量大、难以精确控制扩散速度以及由于重力导致的对流影响等问题,从而限制了该方法的广泛使用。第一个实现将微流控芯片技术应用于蛋白质结晶的是加州理工大学的 Quake 小组,2002 年,Quake^[33]小组研制了基于自由界面扩散原理的蛋白质结晶微流控芯片,如上图 1.6 (a) 所示。他们以微流控芯片 PDMS 微阀技术为基础,利用软光刻技术在聚二甲基硅氧烷(PDMS)材料上制作一系列复杂的微通道网络和大量的主动控制微阀实现芯片的功能。该芯片共有 48 路进样管道,每个进样管道连接三对不同长度的结晶反应腔,利用反应腔的体积精确控制参与结晶反应的蛋白液和沉淀剂的体积和配比,并利用微阀控制蛋白液和沉淀剂的界面形成。

2010 年,Iamagilov 小组以微流控滑动芯片技术为基础进一步发展了一种基于自由界面扩散的芯片^[38, 44, 45]。该芯片在上层基片上加工了蛋白质溶液引入管道和沉淀剂储液微孔,在下层基片加工了沉淀剂引入管道和蛋白质储液微孔,同时增加了连接蛋白质和沉淀剂微孔的多条微管道,芯片如图 1.8 a 所示。实验时,首先将上层基片的沉淀剂微孔与下层基片的沉淀剂引入管道对准,注入不同的沉淀剂溶液,滑动芯片以形成分离的沉淀剂液滴;然后将上层基片的蛋白质引入管道与下层基片的蛋白质微孔对准,注入蛋白质溶液,滑动芯片,含有蛋白质和沉淀剂的微孔通过微管道进行连接,蛋白质溶液和沉淀剂溶液在微管道内发生扩散,进行自由界面扩散结晶。该滑动芯片能够同时实现微批量结晶法和自由界面扩散结晶法,芯片上加工有 16 个独立的微流体单元,每个单元具有 5 个微批量结晶反应器和 6 个自由界面扩散结晶反应器,因此单块芯片能够进行 176 种不同条件的结晶筛选实验,而蛋白质的消耗量仅为 4 μ L。将该复合式结晶芯片应用于结核杆菌水合酶和牛焦虫二氢叶酸还原酶/胸苷酸合成酶结晶条件的筛选,结果表明,该复合式自由界面扩散芯片能够筛选出与 SSGCID 不同的结晶条件,而且获得的蛋白质晶体用于 X 射线衍射具有更高的分辨率点。

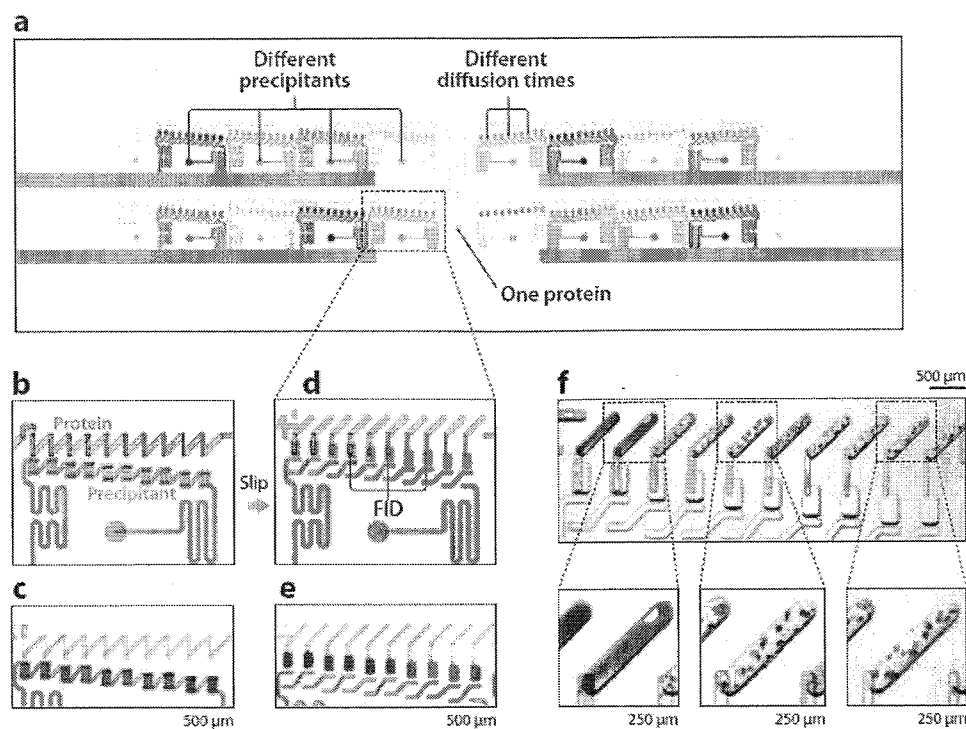


图 1.8^[45]以滑动芯片技术为基础的自由界面扩散微流控芯片：(a) 滑动芯片的原理示意图；(b) 装载蛋白质和沉淀剂后的芯片示意图；(d) 蛋白质和沉淀剂微孔通过微管道连接实现自由界面扩散；(c) 和 (e) 分别是图 (b) 和 (d) 的显微放大图片；(f) 扩散时间对蛋白质储液微孔中蛋白质结晶的影响

(3) 基于平衡透析结晶的微流控结晶芯片

传统的透析结晶技术通常是利用半透膜包裹蛋白质溶液，并将蛋白质溶液浸入到一定浓度的盐溶液中，这样半透膜两侧溶液存在浓度差，然后利用半透膜允许小分子通过而大分子无法通过的性质，调节蛋白质溶液的浓度，从而使蛋白质溶液缓慢趋于过饱和而结晶。实验中，通过改变半透膜外侧盐溶液的浓度，来达到对蛋白质结晶过程中晶体成核和晶体成长过程的独立优化，以获得优质蛋白质晶体。但是以上介绍的三种微流控蛋白质结晶芯片技术其结晶路径和结晶过程都是不可逆的，使得结晶过程的控制和优化具有非常大的难度。鉴于传统透析结晶技术的调节优化优势和微流控芯片技术的快速发展，Brandeis 大学的 Fraden 小组^[46, 47]将微流控芯片技术与传统透析结晶方法相结合，实现了基于平衡透析结晶原理的可实时控制和观察蛋白质溶液结晶行为的微流控结晶芯片。他们也是采用 PDMS 材料制作用于蛋白质透析结晶的微流控芯片，该芯片由上下两层 PDMS 芯片封合而成，其中上层 PDMS 芯片用于液滴的生成和存储，下层 PDMS 芯片通入盐溶液来调节渗透压。研究表明 PDMS 膜对水分子具有一定的通透性，而对蛋白质、聚乙二醇(PEG) 和盐是不通透的，所以他们同时利用 PDMS 作为半透膜隔开蛋白质结晶液滴和盐溶液。当半透膜两侧的蛋白质结晶液滴和盐溶液存在渗透压差时，水分子可以透过半透膜在两侧实现交换。若蛋白质结

晶液滴渗透压低于盐溶液的渗透压,则蛋白质结晶液滴中的水分子将透过半透膜扩散至盐溶液一侧,从而使蛋白质结晶液滴中蛋白质浓度升高达到过饱和状态并形成蛋白质分子结晶;若蛋白质结晶液滴渗透压高于盐溶液的渗透压,则盐溶液中的水分子将透过半透膜扩散至另一侧的蛋白质结晶液滴中,使蛋白质结晶液滴中蛋白质浓度降低或溶解蛋白结晶体。

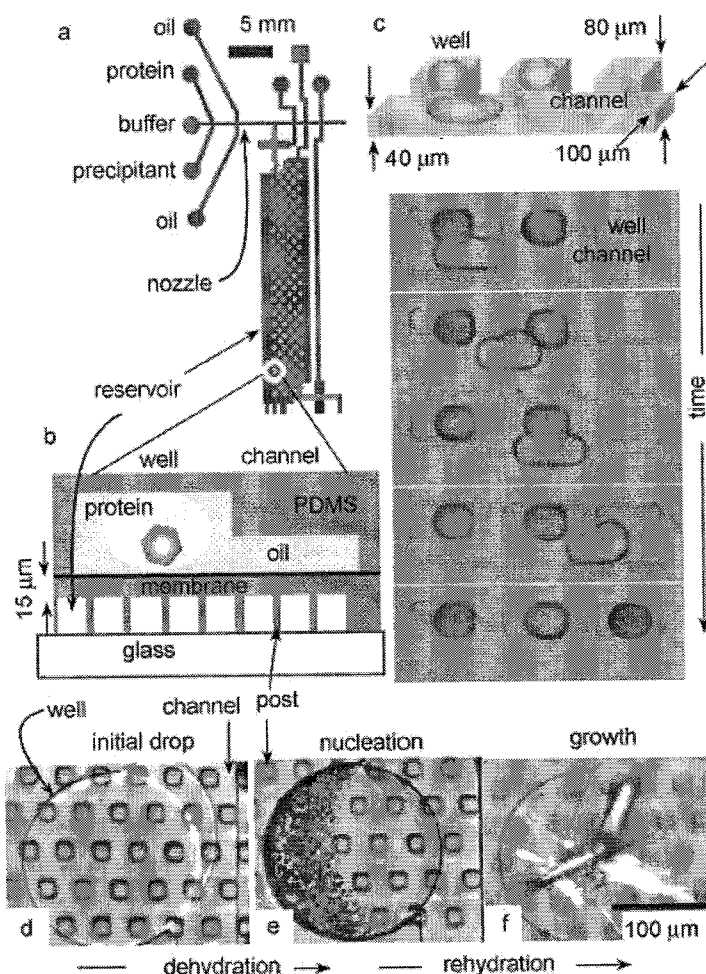


图 1.9 基于透析原理的微流控结晶芯片: (a) 结晶芯片平面示意图; (b) 结晶芯片结晶单元垂直示意图; (c) 基于表面张力的样品液滴自定位示意图; (d-f) 基于可逆透析膜的蛋白质结晶时序图

实验中,首先在各进样口加入样品后,液体在芯片上微阀结构的调控下进入指定的储液管道,并在表面张力的作用自动进入储液管道两侧的结晶槽中。然后在下层 PDMS 芯片通道中连续注入高浓度的 NaCl 溶液,使 PDMS 薄膜两侧的蛋白质溶液和盐溶液产生一定的浓度差,在渗透压差作用下蛋白质结晶液滴慢慢失水,蛋白质溶液达到过饱和,出现大量微晶,此时的溶液浓度条件位于成核区;最后再将下层 PDMS 芯片通道中的 NaCl 溶液换成低浓度的 NaCl 溶液,使蛋白质结晶液滴的浓度高于下层管道盐溶液的浓度,水分子逐渐扩散至蛋白质溶液中,使蛋白质和沉淀剂的浓度逐

渐降低,部分微晶重新溶解,溶液浓度条件进入结晶生长区,从而获得较大尺寸的蛋白质单晶。通过这种实时观察和动态调节的方式,可精确控制蛋白质结晶中的成核过程与晶体生长过程,从而提高晶体的质量。另外,他们在微流控芯片的样品分配方面也有一定突破,提出了一种基于表面张力液滴自定位的设计(图 1.9 c),巧妙地解决了蛋白质结晶液滴自动化分配问题,不足之处是这种结构还要求液滴大小必须与结晶槽大小匹配,否则液滴容易从槽中脱离。

罗娅慧^[48]等同样利用 PDMS 材料的透气性,制作了基于平衡透析的集成多个渗透脱水通道的蛋白质结晶筛选芯片。该芯片包括样品进样管道层、PDMS 透析膜、脱水通道层及玻片 4 层组成,其利用 PDMS 脱气处理后重新溶解空气产生的负压作为驱动力完成样品的自动进样,在脱水通道中加入不同浓度的盐溶液,使样品溶液与脱水通道层之间通过 PDMS 透析膜进行水分子的渗透扩散,单次可实现 96 个蛋白质结晶条件筛选。

(4) 基于蒸发扩散结晶的微流控结晶芯片

芝加哥大学的 Ismagilov 小组在上述油下结晶微流控技术基础上的一种改进,实现了基于蒸发扩散的微流控结晶芯片的设计^[36]。该芯片也是利用基于两相流的离散微流控芯片形成一系列的蛋白质结晶分散液滴,不同之处在于这里的连续相采用对水分子具有一定通透性的油相,并且在每个蛋白质结晶液滴一侧排列一滴高浓度盐溶液如图 1.6 (b) 所示。利用具有双 T 型通道的复合芯片交替生成配对的蛋白质结晶液滴和高浓度盐溶液液滴,并以能透水蒸汽的油相间隔,收集于毛细管中进行反应。由于水分子在油相溶液中有微量的溶解性,在高浓度盐溶液和蛋白质结晶溶液之间形成的渗透压差作用下,水分子不断蒸发扩散,蛋白质结晶液滴逐渐失水,液滴中蛋白质溶液缓慢达到过饱和,进而得到蛋白质晶体。在微通道内,水分子质量的传输可以通过流体速度和时间等调节,有利于蛋白质晶体的控制生长。与微流控油下结晶技术类似,基于蒸发扩散的微流控结晶技术的蛋白质结晶反应也是在玻璃毛细管中完成的,因此其蛋白结晶产物也可以直接在毛细管中进行 X 射线衍射分析。Ismagilov 小组还利用该芯片系统地研究了液滴间距对蒸发扩散速率的影响,绘出了扩散速率与距离的关系曲线,指出降低蒸发速率可以使结晶产物更大、数量更少、质量更高。

Hansen 等结合 PDMS 微阀技术和液滴技术,发展了一种集成化、大规模的基于蒸发扩散原理的微流控蛋白质条件筛选系统,芯片如图 1.10 所示^[49]。该系统首先利用 PDMS 微阀技术对流体进行灵活的操纵,实验中,利用微管道及阀门结构实现蛋白质溶液和沉淀剂溶液的自动进样和快速混合;然后将混合后的反应液导入到液滴形成区域,使混合溶液在油相的包裹下形成反应液滴,并存储于 16 条平行的微阵列通道中,在微阵列的下方设计渗透浴,使通道中的液滴在渗透压的作用下脱水,实现蒸发扩散结晶。图 1.10 中,在一个芯片上可以完成溶液的进样混合、液滴形成及液滴孵育以形成蛋白质晶体,该芯片示意图主要包括三个集成单元,从右到左依次为:原

理示意图显示模块，液滴注射模块，液滴存储及渗透浴模块。

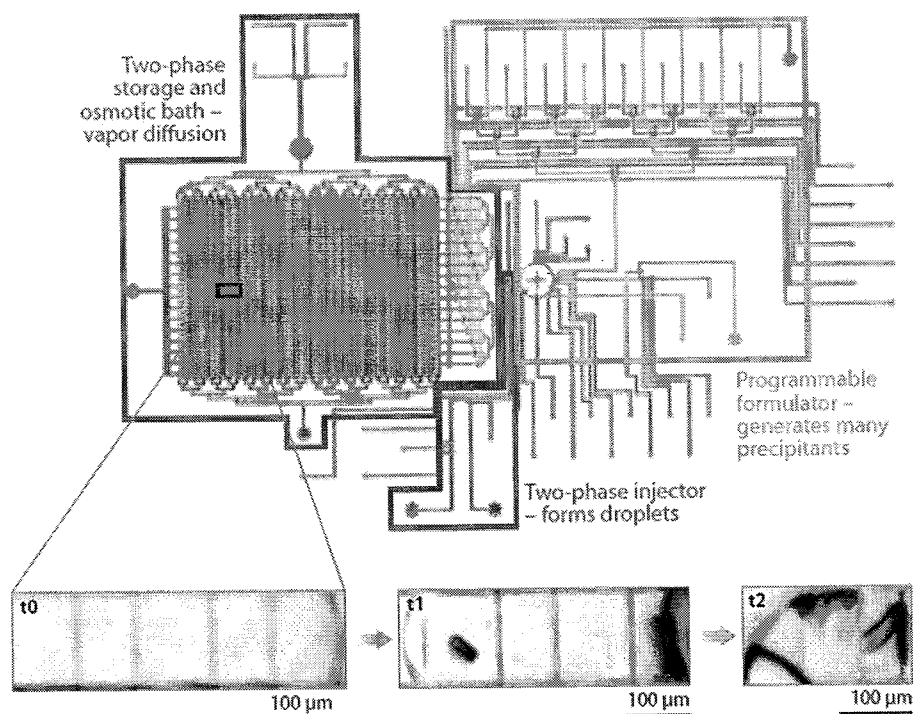


图 1.10 基于蒸发扩散结晶的微流控蛋白质结晶芯片

该蒸发扩散型芯片能够在 $10\text{mm} \times 7\text{mm}$ 的芯片区域内存储 400 个体积为 2nL 的蛋白质液滴反应器，实现高通量的蛋白质结晶条件筛选。

综上所述，微流控技术应用于蛋白质结晶条件筛选研究取得了可喜的进展，从 Quake 等第一次将微流控芯片技术与传统蛋白质结晶方法相结合研制出第一款微流控蛋白质结晶芯片以来，目前几乎所有的传统蛋白质结晶方法都能在微流控平台上实现，并且与传统方法相比在样品消耗量、操作复杂度、结晶条件调控等方面都具有非常大的技术优势，但是直到目前现有的微流控蛋白质结晶芯片在传统结构生物学实验室中并未得到广泛使用，因此实现简单、实用、接纳度高的微流控蛋白质结晶芯片成为微流控技术继续应用于结构生物学领域的一个重要发展方向。

1.4 本课题的研究思路

前文介绍了蛋白质结晶的历史、原理、微流控技术应用于蛋白质结晶的应用进展以及现存的几种典型的微流控蛋白质结晶芯片。但是从结晶筛选模式来说，现有的微流控蛋白质结晶芯片大多是围绕液-液扩散结晶方法和批量结晶方法来设计制作的，而目前结构生物学实验室中应用最广泛的气相扩散结晶筛选方法还未在微流控平台上真正实现，因此导致现有的微流控结晶芯片并未得到广泛接纳和应用。针对现有蛋

白质结晶芯片的局限, 本文从现有的无源微流控蛋白质结晶芯片结构入手设计和开发一种可实现传统气相扩散结晶模式的微流控蛋白质结晶芯片。

本课题具体研究思路为:

1、研究和探索将传统气相扩散结晶方法移植到微流控芯片上的设计方法及结构设计制作方案。

2、通过微管道和隔离腔的特殊几何结构设计, 达到在微流控芯片上实现气相扩散结晶方法的目的, 并利用微细加工技术, 在实验室现有的条件下, 以 SU-8, PI, PDMS, 硅片等为原材料, 加工制作微流控蛋白质结晶芯片。

3、研究芯片的实际性能, 并与传统的扩散结晶方法相对比, 验证芯片的实用性, 使其能够在实际中得到应用。

1.5 本章小结

目前蛋白质结晶是限制结构生物学研究的一个重要瓶颈, 而筛选合适的蛋白质结晶条件是获得优质晶体的第一步, 多数实验室还是利用传统的试错方法来进行大批量蛋白质结晶条件筛选, 对蛋白质的样品量, 人力资源和时间消耗量巨大。微流控技术的发展为蛋白质结晶筛选提供了一个重要的技术平台, 无论在结晶条件筛选, 试剂消耗量还是操作流程方面, 微流控芯片的特点使得微流控技术在蛋白质结晶条件筛选领域都有很多明显的优势, 微流控技术应用于蛋白质结晶研究也取得了一定的成果。而气相扩散型微流控蛋白质结晶芯片利用现有的无源微流控结晶芯片为平台将结构生物学实验人员最熟悉的气相扩散结晶方法移植到微流控芯片上, 充分发挥微流控技术低耗样、高通量、快速的优势, 提高了微流控蛋白质结晶芯片的实用性及接纳度, 从而大大加快微流控蛋白质结晶系统的研究及应用。

第二章 气相扩散型蛋白质结晶芯片

2.1 引言

目前蛋白质结晶是限制结构生物学研究的一个重要瓶颈。近年来,为了降低样品消耗、提高结晶筛选的通量和效率,人们将微流控技术引入了蛋白质结晶领域^[50],与常规的蛋白质结晶条件筛选研究方法相比,微流控技术具有低样品消耗、高通量、加快反应速度、简单方便等优势。根据结晶原理和方法的不同,现有的蛋白质结晶微流控芯片大多是围绕液-液扩散结晶方法和批量结晶方法来设计制作的,主要可分为:微流控自由界面扩散结晶芯片、微流控油下结晶芯片和微流控透析结晶芯片。气相扩散结晶法因其设备简单、操作方便、易于观察和收集晶体等优点成为目前结构生物学实验室中应用最广泛的结晶筛选方法,而该方法还未在微流控平台上真正实现,尽管芝加哥大学的 Ismagilov 小组^[36]开发了基于蒸发扩散的微流控芯片,该芯片以油下结晶技术为基础,利用具有一定通透性的油相作为连续相,在每个蛋白质结晶液滴一侧排列一滴高浓度盐溶液形成渗透压,水分子将透过油相由低浓度的蛋白质溶液扩散至高浓度的盐溶液中,直至蛋白质液滴过饱和形成结晶。但这种蛋白质溶液/油相/盐溶液的方法与以空气作为连续相的传统扩散结晶技术(蛋白质溶液/空气/盐溶液)并不相同,因此导致现有的微流控结晶芯片并未得到广泛接纳和应用。

虽然微流控蛋白质结晶技术取得了突出进展,但是直到目前也仅出现一种商业化的微流控蛋白质结晶产品,这离蛋白质实际结晶要求也还有一定距离,因此要实现快速、完美的蛋白质结晶效果,还有很长的路要走。针对现有蛋白质结晶芯片的局限,本文研究了一种可实现气相扩散结晶模式的微流控蛋白质结晶芯片。该气相扩散型蛋白质结晶芯片将传统的气相扩散结晶方法移植到微流控芯片上,实现传统气相扩散结晶方法与新技术的充分融合,充分发挥微流控技术低耗样、高通量、快速的优势,为提高蛋白质结晶效率服务,同时结合气相扩散型蛋白质结晶芯片也更有利于传统结晶方法积累的大量宝贵经验有效地转移至微流控结晶芯片上,促进结构生物学的快速发展。

2.2 芯片设计

2.2.1 结构设计

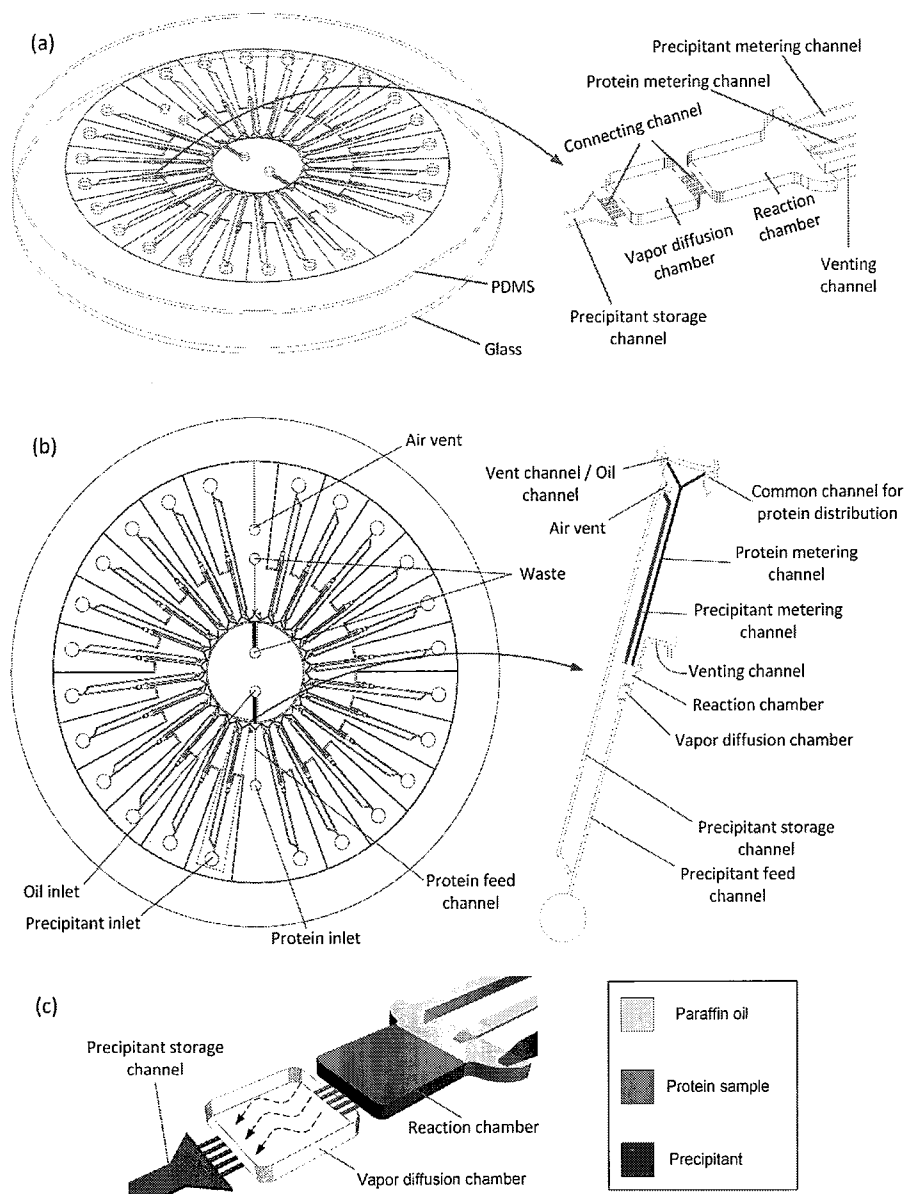


图 2.1 气相扩散型蛋白质结晶芯片结构示意图

芯片的整体结构及三维结构示意图如图 2.1 所示，芯片由含管道结构的疏水性 PDMS 和亲水性玻璃基片可逆键合而成，包括 24 个结晶单元，每个单元均包含沉淀剂定容管道、蛋白质定容管道、结晶反应腔、隔离腔及沉淀剂储液管道等关键功能结构，如图 2.1 (b)。所有的蛋白质定容管道的一端通过一个共同的分配管道连接到蛋白质进样口，而每组沉淀剂定容管道与储液管道有独立的沉淀剂进样口，蛋白质定容

管道和沉淀剂定容管道的出口与反应腔连接以便溶液进入反应腔混合。

2.2.2 工作原理

气相扩散型蛋白质结晶芯片的工作原理是在反应腔与沉淀剂储液管道之间设计隔离腔（图 2.1a）。其中隔离腔两侧通过连接管道分别与结晶反应腔和沉淀剂储液管道相连，使得反应腔中的结晶液和储液管道中的沉淀剂处于一个共通的空间，在浓度差的作用下彼此之间可以发生气相物质交换（图 2.1c），从而可以实现基于气相扩散模式的结晶实验。

该芯片中的流体操控类似于我们以前研制的圆盘式批量型蛋白质结晶芯片^[43]，是通过毛细作用和离心力的协同作用来实现的。该芯片利用毛细微阀作用力（CSV）控制样本在芯片中完成自动充样流程，这种毛细微阀依靠毛细管宽度的突然变化使液体的自由界面产生阻力来阻止液体的流动^[51-53]。根据 Zoval 和 Madou 理论，微阀的最大临界压力可以表示为^[54]：

$$P_c = a \left(\frac{4\gamma_{la}}{D_h} \right) + b \quad (2.1)$$

其中 γ_{la} 是液体空气界面的表面张力， D_h 是毛细管的直径， a 和 b 是经验常数，其值取决于弯月面形状、阀门一端腔体的几何结构以及界面的湿润性。由公式 2.1 可以看出，微阀的最大临界压力与毛细管的直径成反比，毛细管直径越大即毛细管与反应腔连接处横截面积越大产生的压力越小，而毛细管直径越小即横截面积越小产生的压力越大，对流体产生的阻力也就越大。该气相扩散型芯片中首先在沉淀剂、蛋白质定容管道与反应腔连接处设计第一级的微阀结构，该处微管道与反应腔连接处的横截面积较大，使其产生较低的阀门阻力；然后在隔离腔两侧的连接管道处设计第二级微阀结构，该处微管道与反应腔连接处的横截面积较小，使其产生比较大的阀门阻力。芯片自动充样完成后，利用离心机产生介于第一级和第二级微阀阻力的离心力使液体在离心力作用下能够克服第一级微阀阻力进入到反应腔中混合，而由于第二级微阀阻力较大，液体在第二级微阀处停留不能进入隔离腔。实验时，首先加入进样口的蛋白质溶液和沉淀剂在毛细力的作用下自动充满进样管道和定容管道，在定容管道与结晶反应腔结合处，由于毛细微阀的作用，流体自动停止于此；然后，将完成充样的结晶芯片放置于离心机上，通过旋转离心，使得定容管道中的蛋白质和沉淀剂克服毛细微阀的阻力进入结晶反应腔中，实现定量分配和混合。由于连接管道与隔离腔结合处截面很小，所形成的毛细微阀阻力极大，因此可保证离心过程中结晶反应腔中的液体不会因离心力的作用而进入隔离腔中。

2.3 芯片制备

芯片的制备采用成熟的 PDMS 微流控芯片制作工艺，可以分为两个步骤：芯片的模具制备和 PDMS 芯片制备。

2.3.1 芯片的模具的制备

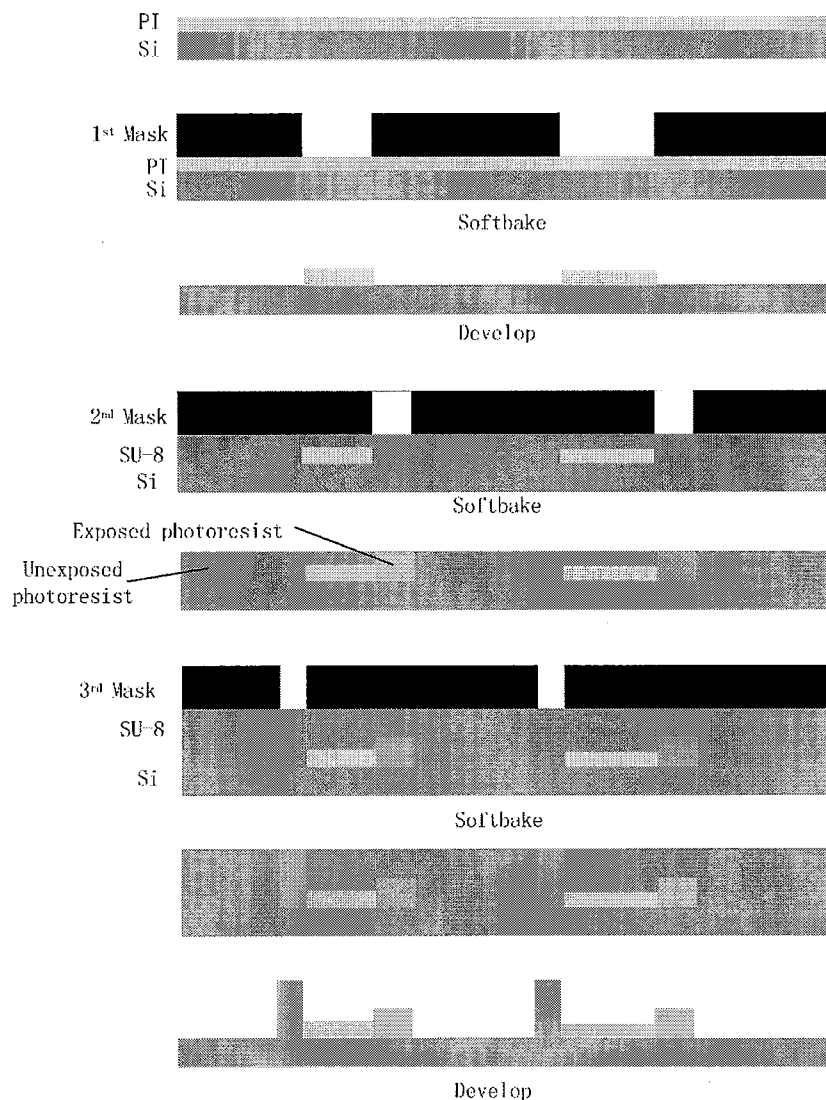


图 2.2 芯片模具制作流程示意图

芯片模具在制备过程中分为三步，第一步制作隔离腔两侧的连接微管道，第二步制作进样口和微管道部分，第三步制作反应腔、隔离腔部分，工艺流程如图 2.2 所示：

1. 清洗硅片：98%浓硫酸和 30%过氧化氢按体积比 5:1 混合，硅片置于混合液中，加热煮沸 30 min，静置冷却后，用去离子水清洗硅片 5-6 次去除残留的混合液；硅片表面用氮气吹干，置于 180 °C 烘箱中 1 h，烘干表面水分。

2. 制作第一层结构-连接管道：选用聚酰亚胺 (PI) 稀释胶 (PI: 1-甲基, 2-吡咯环酮=2:1)，用甩胶台旋涂 (500rpm, 10s, 1000rpm, 30s)。经过前烘 (热板 100℃, 10s)，曝光 (34s)，显影 (PI 专用显影液)，固化标准光刻工艺制作第一层管道结构 (高度为 2μm，宽度为 20 μm)；

3. 制作第二层进样管道和定容管道结构：选用环氧树脂光刻胶 (SU-8 3005, Micro Chem, Newton, MA, USA)，用甩胶台旋涂 (500 rpm 匀胶 12 s; 1000 rpm 甩胶 40 s) 后，静置过夜；用热板 95 °C 前烘 45 min 后待热板自然降至室温，曝光 3 min 25 s；曝光后将硅片避光置于烘箱中，缓慢升温至 95 °C，关闭烘箱电源，待烘箱自然冷却至室温后取出硅片，准备第三层结构的制作。

4. 制作第三层结构——反应腔、隔离腔：硅片模具的第三层是由反应腔和隔离腔构成。将 SU-8 光刻胶旋涂 (300rpm 匀胶 12 s; 1500 rpm 甩胶 40 s) 到已经制作好第二层结构的硅片上，静置过夜；95℃前烘 45 min 后待冷却至室温，将第二层和第三层结构的位置对准后，曝光 5 min；将硅片避光置于烘箱中缓慢升温至 95 °C，关闭烘箱电源，待自然冷却后取出进行后续工艺。

5. 显影和硬烘：硅片第二层和第三层结构制作完成后，将硅片置于 PGMEA 中显影，甩干硅片，用 170 °C 热板加热 20 min，待其自然冷却至室温后取下。

最后制得的硅片模具上各结构单元的尺寸如下，样管道和定容管道：10 μm (height) × 100 μm (width)；反应腔和隔离腔：80 μm (height) × 500 μm (length) × 500 μm (width)；通气管道：80 μm (height) × 30 μm (width)；连接管道：2 μm (height) × 20 μm (width)；进油管道：80 μm (height) × 200 μm (width)。

2.3.2 PDMS 芯片制备

PDMS 芯片的制备示意图如图 2.3 所示。

1. 将 PDMS 预聚体与固化剂以 10:1 的质量比混合搅拌，置于真空环境中 1 小时；

2. 将脱气后的 PDMS 混合物浇注在根据图 2.2 所制备的芯片模具上，并在热板上加热固化 (90℃, 1.5h)，剥离后根据进样口和出样口需要打孔，制得 PDMS 芯片。

3. 将干净的三寸玻片空气等离子处理 (100 Pa, 150 W 条件下处理表面 40 s)，以增加芯片的亲水性，利于样品自动充样。然后将打过孔的 PDMS 芯片有结构的一面贴在玻片上，制得完整的蛋白质结晶芯片，实物图如图 2.4 所示。

PDMS 芯片与玻片是以可逆键合的方式组合，便于后期芯片中形成晶体后可直接将芯片从玻片上剥离，从芯片结晶腔中采集晶体。

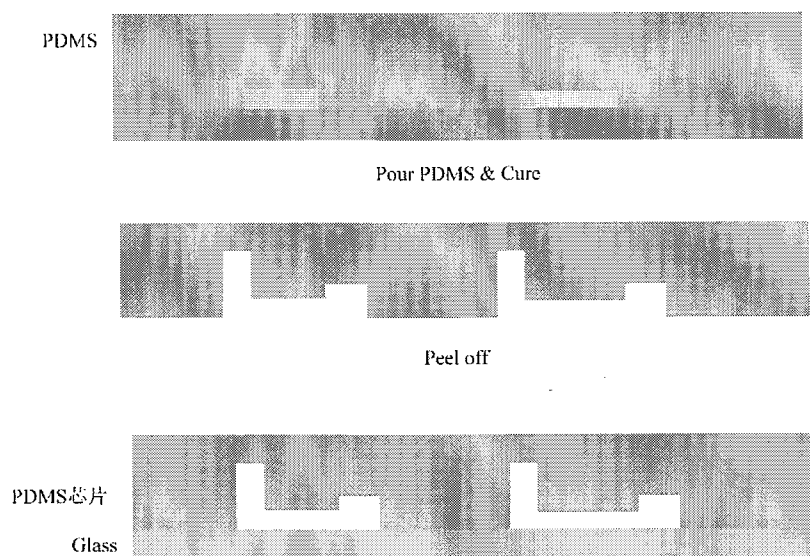


图 2.3 PDMS 芯片制备示意图

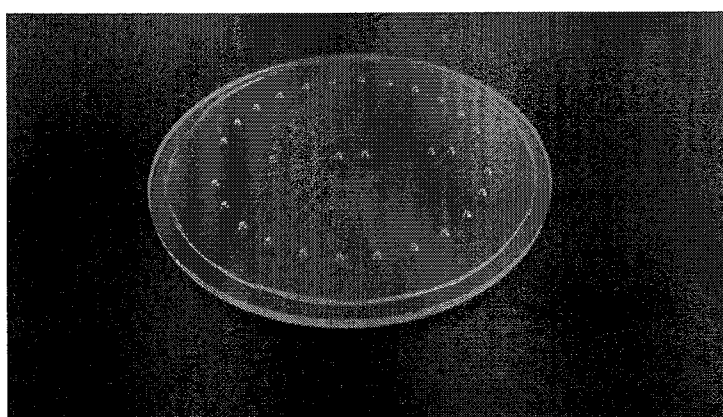


图 2.4 芯片实物图

2.4 芯片自动进样能力测试

2.4.1 自动进样实验步骤

首先在蛋白质溶液进样口和各沉淀剂进样口处加入蛋白质溶液和沉淀剂，在毛细力的作用下，液体自动充满进样管道和定容管道，在定容管道与结晶反应腔结合处，由于毛细微阀的作用，流体自动停止于此；在油相进样口处加入一滴石蜡油，然后将完成充样的结晶芯片放置于离心机（KW-4A, Chemat Technology Inc）上，通过旋转离心（6000rpm, 1min），使得定容管道中的样品和沉淀剂克服第一级毛细微阀的阻力进入结晶反应腔中，实现定量分配和混合，并被石蜡油密封在各反应腔中，形成独立的互不影响的结晶单元。进样完成后，在所有进样口和出样口处加入石蜡油，并用 PVDC 保鲜膜覆盖在芯片表面，实现芯片的密封，以减少反应腔内的液体透过 PDMS

材料和进样口的挥发。最后将蛋白质结晶芯片放入 4℃ 冰箱中，定期观察结晶状况。

2.4.2 自动进样实验结果与讨论

为了验证该芯片的进样分配效果，本文首先用蓝色食品色素和红色食品色素分别代替蛋白溶液和沉淀剂加入到芯片的进样口处完成进样。图 2.5 (a) 和 (b) 分别显示了结晶芯片中毛细自动充样后和离心分配后的照片。由于玻片经过等离子体处理，具有一定的亲水性，加上毛细作用力，两种颜色的溶液自动进入到管道中，在毛细微阀的作用下，液体自动停止于定容管道与结晶反应腔的结合处，如图 2.5 (a) 所示。将芯片放入离心机后，在离心机的作用力下液体进入反应腔实现混合。而且离心过程中反应腔中的液体在极大的毛细微阀阻力作用下并没有进入隔离腔，进样效果显著，如图 2.5 (b) 所示。

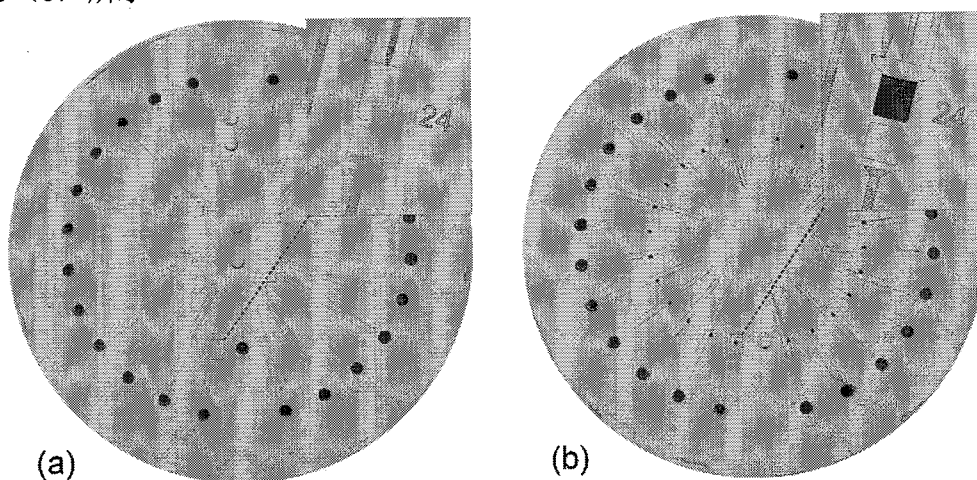


图 2.5 芯片中流体操控照片：(a)毛细自动进样和(b)离心并行分配

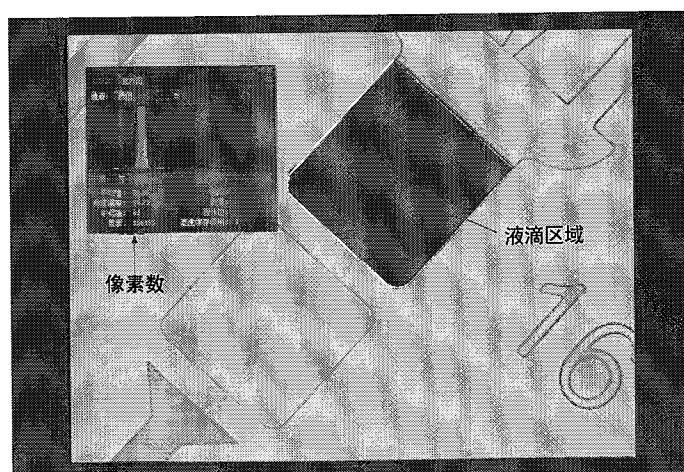


图 2.6 Photoshop 软件获得液体区域的像素数

在进行蛋白质结晶条件筛选实验时，必须保证样本进样的可靠性和均一性，因为反应腔内混合液体体积反应了离心进样后蛋白质溶液和沉淀剂按比例混合的情况，有

可能直接影响结晶反应的结果。为了验证该芯片的进样精确性，我们通过光学显微设备获得进样后结晶芯片中每个结晶微腔中液滴的图像，并利用 Photoshop 图像软件选取该图像中液滴区域，获得该区域所包含的像素数（图 2.6），结合图像分辨率和比例尺计算出液滴图像区域的面积，忽略液滴边缘曲率影响，将此面积值乘以腔体高度（80 μm ）即可获得液滴体积值。其中腔体高度可由台阶仪测定结晶芯片模具获得。通过计算 5 个蛋白质结晶芯片中的 24 个反应腔中的体积，得到进样完成后反应腔内的蛋白质溶液体积平均为 6 nL，CV 值是 4.2%，其中 CV 值的计算公式为：

$$CV = \frac{S}{\bar{x}} \times 100\% \quad (2.2)$$

其中，S 为样本体积标准偏差， $\bar{x}$ 为 24 个液滴中蛋白质体积的平均值。这个数据也证明了该芯片能够实现纳升级的精确进样，提高了筛选结果的可靠性。

2.5 芯片脱水能力测试

2.5.1 脱水实验步骤

本文用脱水实验来验证该气相扩散型芯片的功能性，为了评估蛋白质结晶芯片的气相扩散脱水功能，以蓝色食品色素溶液（1% w/v，上海嘉汇精细化工有限公司）代替蛋白溶液，不同浓度的 NaCl 溶液（5M，3M，1M）作为沉淀剂，完成进样，并通过显微镜每隔一段时间监测和记录各反应腔内液体体积变化状况。由于反应腔的高度是一定的，因此反应腔内液体的体积只与使用 Photoshop 图像软件获得的反应腔内液体的面积范围有关系。

2.5.2 脱水实验结果与讨论

在传统的气相扩散结晶技术中，1 μL 的蛋白质溶液与 1 μL 沉淀剂在盖玻片上混合后，倒置在含有 1mL 沉淀剂的储液槽的上方，形成密闭空间。由于混合液与沉淀剂之间存在浓度差，液体通过空气在两者之间扩散，使蛋白质混合溶液缓慢达到过饱和，形成蛋白质晶体。过饱和度是蛋白质结晶过程的唯一驱动力，是影响蛋白质晶体生长质量的关键因素，如果蛋白质溶液形成过饱和速率过快，往往容易形成大量微晶或有缺陷的晶体；而过饱和度过低，则溶液中会难以形成有效的晶核，从而无法形成晶体。通常情况下，较低的过饱和速率比较适合大体积高质量的单体蛋白质晶体的生长。本文设计的气相扩散型蛋白质结晶芯片通过在反应腔与沉淀剂储液管道之间设计隔离腔来实现的，其原理是利用隔离腔两边沉淀剂浓度和蛋白质溶液的浓度差，使水分子通过带有连接管道的隔离腔从低浓度的反应腔一侧扩散到高浓度的沉淀剂储液管道中，使得反应腔内蛋白质的浓度不断增加，逐渐达到过饱和状态，进而实现可能的结晶。由于在沉淀剂进样口处加入的 NaCl 盐溶液的浓度不同，因而相对应的反应

腔内液体会具有不同的过饱和速率和过饱和度。

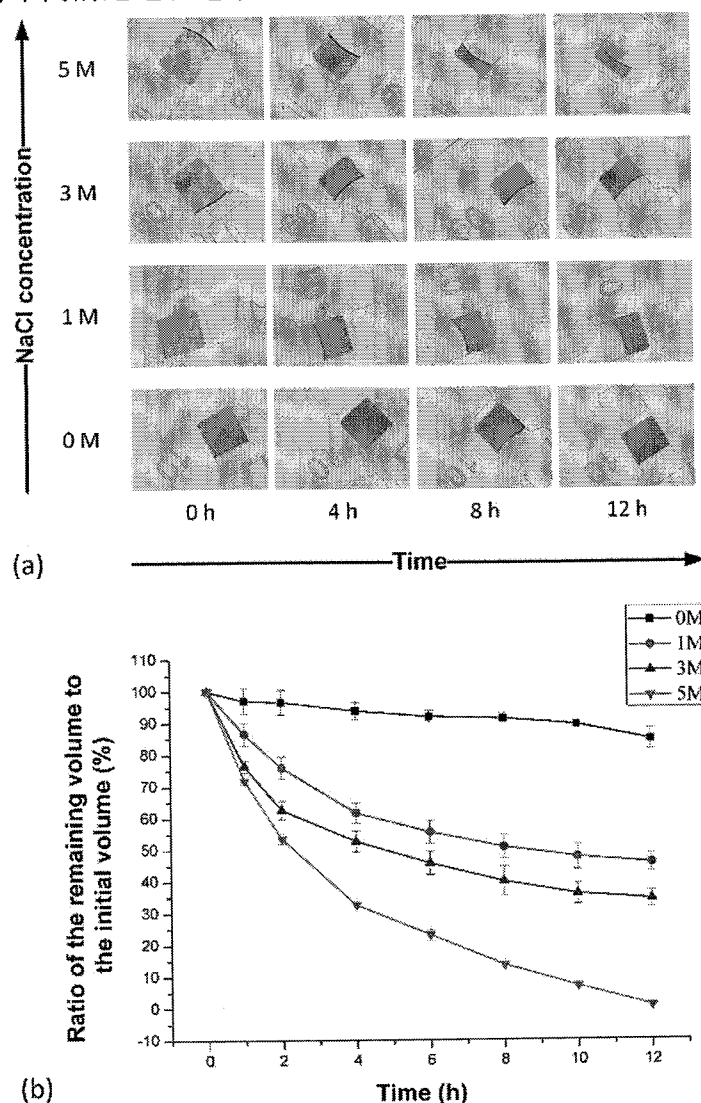


图 2.7 基于不同浓度盐溶液的扩散脱水率实验：(a) 液体的脱水实验图片 (b) 液体扩散脱水曲线图

从图 2.7 (a) 中可以看出，随着时间推移，反应腔内液体体积逐渐减少，液体颜色逐渐加深，这说明在扩散脱水作用下，反应腔内液体中的水分逐渐减少，液体浓度逐渐增大。从图中也可以看出，液体体积变化速率与相对应的盐溶液的浓度有明显的相关性。NaCl 溶液的浓度越高，隔离腔两边溶液的浓度差越大，失水速率越快，与其相对应的反应腔内的液体体积越小。将其应用在蛋白质结晶实验中，则沉淀剂浓度越高，与其相对用的反应腔内的蛋白质溶液形成过饱和的速率就会越快，过饱和度越高。图 2.7 (b) 所示的曲线图更直观的显示了反应腔内液体体积随沉淀剂溶液浓度的变化趋势，液体体积变化随时间几乎呈指数衰减趋势，而且所对应的沉淀剂溶液浓度越高，衰减速率越快。由于扩散脱水过程是可逆的，因此该芯片可以通过加入更高浓

度或更低浓度的沉淀剂来随时改变储液管道中沉淀剂的浓度,控制反应腔内的蛋白质溶液的过饱和和速率,从而筛选出合适的蛋白质结晶条件,获取优质单晶,这种灵活的沉淀剂浓度调节方案能够缩小结晶条件筛选空间,传统的结晶技术是很难实现的。

2.6 蛋白质结晶实验

2.6.1 蛋白质结晶实验步骤

本节利用五种标准模式蛋白,三类(144个)不同的沉淀剂条件来验证所制备的气相扩散型结晶芯片的结晶条件筛选性能。这五种蛋白质样品分别为溶菌酶(lysozyme, 50 mg/ml in 0.02 M sodium acetate trihydrate pH 4.6),木聚糖酶(xylanase, 20 mg/ml in 0.1 M Na/K phosphate, 24% glycerol),脂肪酶(lipase B, 30 mg/ml in sterile filtered, deionized water),葡萄糖异构酶(glucose isomerase, 20 mg/ml in 10 mM HEPES pH 7.0, 1 mM magnesium chloride)和嗜热菌蛋白酶(thermolysin, 25 mg/ml in 0.05 M sodium hydroxide)。同时,用传统悬滴结晶技术作对比,在芯片实验中,1 μ L的蛋白质溶液对应芯片上24种不同的沉淀剂条件,在毛细力和离心力的作用下,蛋白质溶液和沉淀剂按照1:1比例在反应腔中完全混合,并被石蜡油密封在反应腔中,并且保证每个沉淀剂进样口里面都有足量的沉淀剂溶液,使储液管道中充满沉淀剂溶液通过隔离腔与反应腔内的混合溶液进行气相扩散。在悬滴结晶实验中,将1 μ L蛋白样品与1 μ L沉淀剂加到一个盖玻片上充分混合,然后将盖玻片倒置,使混合液体悬滴在含有0.5 ml沉淀剂的储液槽上方,形成密闭空间,使样品通过空气在两种溶液间进行气相扩散。悬滴结晶实验和气相扩散型芯片实验进样完成后,密封放入4 $^{\circ}$ C环境中,两周时间,每天观察盖玻片和芯片反应腔中蛋白质的结晶情况,记录结晶条件。

2.6.2 蛋白质结晶实验结果与讨论

气相扩散芯片使用溶菌酶、木聚糖酶、脂肪酶、葡萄糖异构酶和嗜热菌蛋白酶做144种沉淀剂的结晶条件筛选实验。由于反应腔内的液体是蛋白质溶液与沉淀剂按照1:1混合的溶液,使混合溶液中沉淀剂的浓度降低与储液管道中的沉淀剂溶液产生浓度差,水分子通过隔离腔及连接管道以空气为媒介扩散至储液管道中,使反应腔内的液体浓度逐渐增加,蛋白质溶液逐渐达到过饱和状态形成蛋白质晶体。为了确保结晶条件的重复再现性,我们对每个蛋白所对应的每个沉淀剂条件都做了至少三次结晶统计实验。为了与芯片实验相对比,本文也使用传统的悬滴结晶技术重复了上述实验。图2.8是五种蛋白质分别在芯片反应腔中形成的晶体显微图片,由图可以看出不同的蛋白质获得的蛋白质晶体不尽相同,五种模式蛋白质均获得了较大颗粒的优质晶体,

验证该气相扩散型结晶芯片可用于蛋白质结晶条件筛选。图 2.9 则是两种方法筛选出来的每种蛋白的结晶条件数目对比。

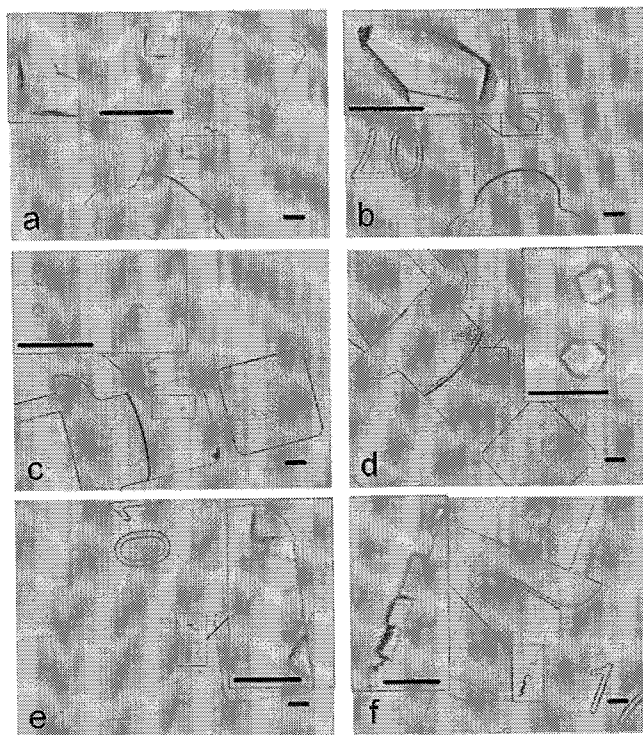


图 2.8 芯片中五种蛋白质的结晶图片：(a) (b) 溶菌酶 (c) 葡萄糖异构酶 (d) 嗜热菌蛋白酶 (e) 脂肪酶 (f) 木聚糖酶 注：标尺为 100 μ m

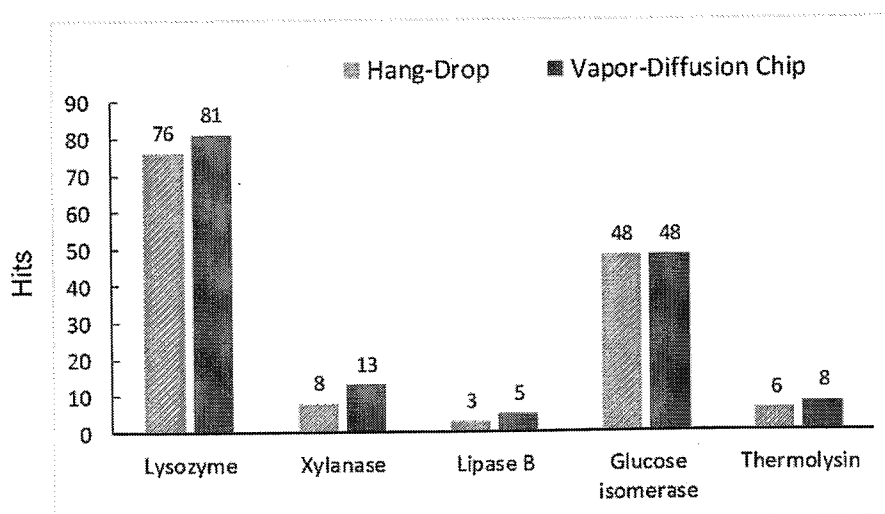


图 2.9 144 种结晶条件中筛选出来的蛋白质结晶数目柱状图

从图中可以看出除葡萄糖异构酶筛选出的结晶条件与传统悬滴方法相当外，其他四种蛋白，芯片上筛选出来的可结晶条件数目都优于传统悬滴方法的筛选结果，尤其是对木聚糖酶、脂肪酶和嗜热菌蛋白酶三种不易结晶的蛋白质也表现出更好的筛选结

果。也就是说用气相扩散型结晶芯片做蛋白质结晶条件筛选要优于传统悬滴结晶方法,而且同样适用于难以结晶的蛋白质样品。表 1 对两种结晶方法的筛选数据做了更详细的对比。表 1 可以看出每种结晶方法都能筛选出不同于另一种方法的结晶条件,表明气相扩散型蛋白质结晶芯片能够替代传统悬滴方法用于做蛋白质结晶条件的初步筛选。

TABLE I. Summary of crystallization conditions found by the two methods.

Protein		Vapor diffusion chip	Hang-drop technique
Lysozyme	A ^a	81	76
	B ^b	27	19
Xylanase	A	13	8
	B	7	2
Glucose Isomerase	A	48	48
	B	23	23
Lipase B	A	5	3
	B	3	1
Thermolysin	A	8	6
	B	7	5

^aA represents the number of crystallisation conditions found.

^bB represents the number of conditions unique to method.

2.7 芯片上蛋白质结晶条件浓度优化

蛋白质结晶条件筛选实验显示有些沉淀剂条件形成大量微晶,表明该沉淀剂条件下蛋白质溶液的过饱和速率过快,不足以获得优质的蛋白质晶体。而该芯片中蛋白质的过饱和速率是通过储液管道中沉淀剂溶液与反应腔内混合液体的浓度差来控制的,而蛋白质结晶是可逆的过程,所以可以通过调节进样口中沉淀剂的浓度来调节储液管道中沉淀剂溶液与蛋白质溶液的浓度差,进而调节蛋白质溶液的过饱和率或者使微晶重新溶解再逐步形成可进行 X 射线衍射的优质大颗粒晶体。本实验尝试调节优化形成大量微晶的沉淀剂的浓度使其获得优质蛋白质晶体。

2.7.1 浓度优化实验步骤

实验以前面的蛋白质结晶实验为基础,首先从筛选出的结晶条件中选取形成大量微晶的沉淀剂条件作为优化对象,结晶过程中采用定时间隔稀释进样池中沉淀剂浓度实现调控;具体调控程序采用加样后的初始 6 小时每隔一定时间进行 2:1 稀释的程序。选择的结晶条件为: PEG7 (0.2 M 二水合氯化钙, 20% w/v 聚乙二醇 3,350),

PEG15 (0.2 M 硝酸锂, 20% w/v 聚乙二醇 3,350), PEG16 (0.2 M 六水合硝酸镁, 20% w/v 聚乙二醇 3,350), PEG17 (0.2 M 硝酸钠, 20% w/v 聚乙二醇 3,350)。间隔时间初步设计为: 10 min, 20 min, 30min, 60 min, 为了显示浓度优化后的结晶效果, 设计一组未调控的空白对比实验, 放入相同的环境中, 每隔 2h 记录观察反应腔内蛋白质结晶状况的变化。

2.7.2 浓度优化实验结果与讨论

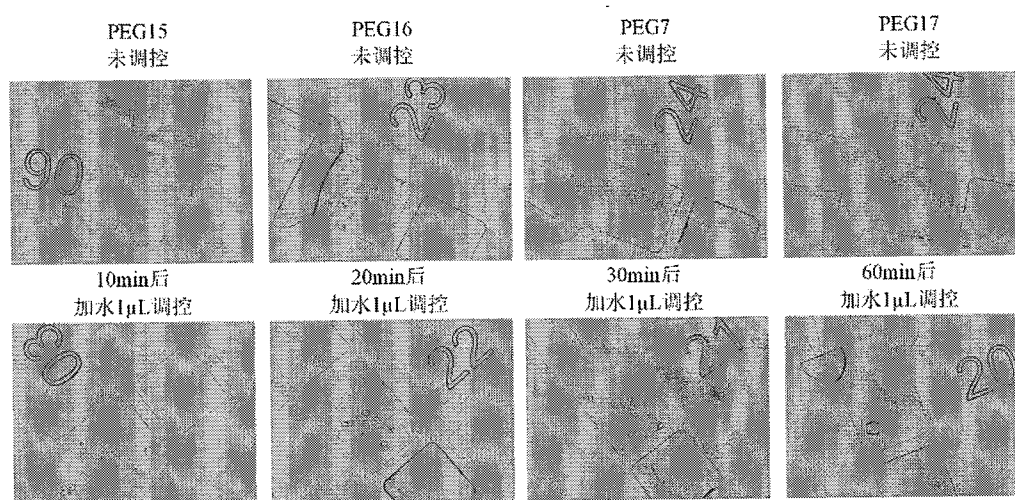


图 2.10 各沉淀剂条件未调控及浓度优化后结晶对比图

各结晶条件的结果如图 2.10 所示, 由图可以看出, 这四种沉淀剂在未加任何调控的条件下, 反应腔内蛋白质形成大量微晶。经过在不同时间间隔后将沉淀剂浓度稀释为原来的一半的操作后, 原本会形成微晶的反应腔内蛋白质溶液形成了颗粒较大的晶体, 晶体的数目明显减少, 而且在不同时间间隔后加水稀释沉淀剂浓度所产生的调节作用也有所不同。浓度优化调节实验初步显示了通过实时调节进样池内沉淀剂的浓度来改变浓度差, 从而进一步控制反应腔内蛋白质溶液的过饱和和速率是可行的, 本实验只是进行了初步的实验验证, 而稀释沉淀剂的加水量以及在何时进行沉淀剂浓度稀释才能获得最好的蛋白质结晶效果, 仍然需要大量系统的实验来进一步测试验证。

2.8 本章小结

气相扩散结晶法因其设备简单、易于观察、收集晶体等优点成为目前结构生物学实验室中应用最广泛的结晶筛选方法, 但仍然存在样品消耗量大、成功率不高、灵敏度低等局限, 而微流控芯片能够降低样品消耗, 提高结晶筛选的通量和效率, 在实用性和经济性上具有得天独厚的优势。针对现有蛋白质结晶芯片及传统气相扩散结晶方法的局限, 本章设计了一种气相扩散型微流控蛋白质结晶芯片, 该芯片通过反应腔与

储液管道之间的隔离腔设计实现了芯片上气相扩散结晶,将传统的气相扩散结晶方法移植到微流控芯片上,能够克服传统气相扩散结晶方法的局限,充分发挥微流控技术在结晶条件筛选、试剂消耗量和操作流程方面的优势,同时将传统气相扩散结晶方法积累的大量宝贵经验有效地转移至微流控结晶芯片上,实现传统方法与新技术的充分融合,促进结构生物学的快速发展。该芯片采用毛细微阀结构控制芯片中液体流动的趋势,并通过改变毛细管直径的大小设计能够产生不同微阀阻力的阀门结构,使液体在离心力的作用下克服微阀阻力完成精确进样;芯片上气相扩散脱水实验验证了芯片结构设计的合理性及气相扩散调节的功能性,利用该气相扩散型结晶芯片做蛋白质结晶条件筛选实验,结果显示该芯片与传统方法相对比,能够筛选出更多的结晶条件,显示出在条件筛选方面的优越性。而且我们可以通过调节进样口中沉淀剂的浓度,来改变储液管道中溶液与反应腔内蛋白质溶液之间的浓度差,从而改变蛋白质溶液的过饱和速率,为进一步进行蛋白质结晶条件浓度优化提供了平台。

第三章 梯度气相扩散型蛋白质结晶芯片

3.1 引言

高质量的蛋白质晶体是 X 射线衍射技术测定蛋白质结构的前提,从常规的蛋白质结晶实验流程来说,目前实验室蛋白质结晶过程通常分为筛选与优化两个过程。筛选,就是试验各种可能条件确定待结晶蛋白质不可溶的临界条件,以获得适于蛋白质结晶的体系。优化,就是在已筛选获得的结晶体系下,通过调节相关参数和条件改变晶体的尺寸和衍射质量。目前结构生物学实验室往往是先利用现有的蛋白质结晶装置进行蛋白质结晶条件的初级筛选,然后在初级筛选的结晶条件基础上,配制新的蛋白质样品液和结晶试剂进行优化,寻找合适的单晶形成条件,使得优化过程耗时较长,蛋白质样品耗用量相对较高。蛋白质结晶是一个受多因素影响的复杂的过程,饱和度是获得蛋白质晶体的唯一驱动力,而过饱和速率是能否获得优质单晶的关键因素,如何精确控制蛋白质结晶过程中的过饱和速率是结构生物学的一个难题,现有的微流控蛋白质结晶芯片能够实现高通量的蛋白质结晶条件筛选, Hansen 等也以微流控液滴技术为基础设计了适合大规模蛋白质结晶条件筛选和优化的微流控结晶芯片,但是以传统气相扩散为基础的蛋白质结晶芯片还没有实现芯片上蛋白质结晶条件优化的功能。

PDMS 材料具有易于加工、透光性好、成本低廉、性质稳定等优良性质,是目前蛋白质结晶微流控芯片制作中应用最广泛的一种材料^[55-59]。实际应用中,基于 PDMS 材料的微流控芯片组装形式主要有两种:全 PDMS 微流体芯片和混合 PDMS 微流体芯片。全 PDMS 微流控芯片^[60]是指把印有微通道网络的 PDMS 芯片与另一片平整的 PDMS 基片直接粘贴在一起,如图 3.1 (a);混合 PDMS 微流控芯片^[61]是把 PDMS 盖片与另一平整的刚性基片(包括玻璃、石英、PMMA 等)粘贴在一起,如图 3.1 (b)。虽然这两种基于 PDMS 材料的微流控芯片在实际中得到了广泛应用,但是也存在一些致命弱点,比如 PDMS 的低杨氏模量特性导致管道易发生坍塌和形变,PDMS 材料的高通透性导致管道中溶剂易挥发等。尤其是现有的 PDMS 芯片中溶剂挥发问题大大限制了其应用范围,尤其是在长时间的蛋白质条件实验中。为了发挥 PDMS 材料的优势,同时又克服现有的基于 PDMS 的微流控芯片的溶剂挥发问题,一些研究者开发了基于 PDMS 的夹心式微流控芯片,比如利用聚对二甲苯(parylene, PA)包覆的夹心式 PDMS 微流控芯片和利用聚偏二氯乙烯(polyvinylidene chloride, PVDC)包覆的夹心式 PDMS 微流控芯片,但是这些夹心式 PDMS 微流控芯片加工过程繁琐、成本较高。

针对现有的蛋白质结晶微流控芯片在结晶条件优化及 PDMS 材料溶剂挥发不利于长时间的蛋白质结晶筛选优化的局限性, 本文设计了一种梯度气相扩散型微流控芯片用于蛋白质结晶优化, 并提出了利用玻璃夹持结构化 PDMS 薄膜结构, 制作低溶剂挥发微流控芯片的设想。由于玻璃相对聚合物具有更低的通透性, 因此基于玻璃基质的夹心式微流控芯片具有更好的挥发抑制性能, 而且该方法相对现有的 PDMS 微流控芯片加工工艺, 仅多了一步结构化 PDMS 薄膜转移步骤, 过程简单、加工成本低廉, 因此具有突出的优势。最后, 我们利用“玻璃-PDMS 薄膜-玻璃”夹心式工艺制作了梯度气相扩散型蛋白质结晶芯片, 并用该微流控芯片进行了蛋白质结晶和结晶条件优化实验, 证实了该芯片低溶剂挥发及结晶条件优化应用方面的实用性。

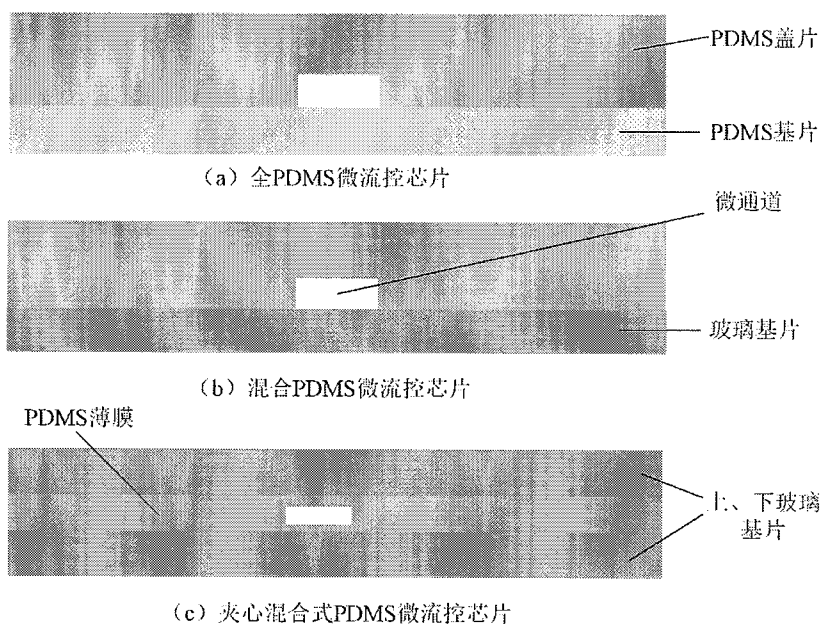


图 3.1 三种 PDMS 微流控芯片结构示意图

3.2 芯片设计及工艺制备

3.2.1 芯片设计原理

梯度气相扩散型蛋白质结晶芯片进行蛋白质结晶条件优化的原理是通过调节芯片中液体在微管道内的气相扩散速率来控制蛋白质溶液的过饱和度。气相扩散率(J)是指在相对稳定的环境中, 单位时间内通过气相扩散方式溶液体积的减少量, 可以表示为^[62, 63]:

$$J = K(\Delta P)(A/L) \quad (3.1)$$

其中, K 是芯片管道中总的传质系数, ΔP 是蛋白质溶液周围与外界环境之间的气压差, A 和 L 是用于气相扩散的微管道的尺寸, 其中 A 是管道的横截面积, L 是微

管道的长度。在液体气相扩散的过程中，气压差对蛋白质溶液和沉淀剂溶液浓度的影响是非常微弱的，可以认为是常数。从公式 3.1 可以看出，在特定的蛋白质与沉淀剂浓度差环境下，微管道内的气相扩散速率只与微管道的尺寸有关。

蛋白质溶液的过饱和速率是随时间变化的，其与反应腔内沉淀剂的浓度及在该浓度下蛋白质的饱和度有关，用 S 来表示蛋白质溶液的过饱和度^[16]，则：

$$S(t) = C_p(t)/C_{sat}(t) \quad (3.2)$$

其中 C_p 是反应腔内蛋白质溶液的浓度，而 C_{sat} 是反应腔内蛋白质溶液的饱和浓度；在一定的浓度差作用下，随着时间的增加，水分子通过微管道进行气相扩散，反应腔内液体体积逐渐减少，因此 C_p 增加； C_{sat} 与溶液内沉淀剂特性及沉淀剂浓度 C_s 有关，一般表示为 $C_{sat} = \alpha \exp(-\beta[C_s])$ ， α 和 β 是与蛋白质在特定沉淀剂溶液中溶解度相对应的常数，由于反应腔内沉淀剂的浓度 C_s 也在随着时间增加， C_{sat} 因此逐渐降低。 $S = 1$ 是蛋白质析出的临界点。用 $C_i(t)$ 表示在某一时刻反应腔内一种溶液的浓度， i 代表蛋白质或沉淀剂， C_{i0} 和 V_0 表示反应腔内个溶液的初始浓度及溶液的初始体积，则：

$$C_i(t) = \frac{C_{i0}V_0}{V(t)} = \frac{C_{i0}V_0}{V_0 - Jt} \quad (3.3)$$

结合公式 3.2 和 3.3 可以看出，在蛋白质溶液和沉淀剂初始浓度一定的情况下，反应腔内蛋白质溶液的过饱和度仅依赖于气相扩散速率 J ，因此在后续的设计和准备工作中，我们可以通过调节微管道的尺寸（ L 和 A ）改变反应腔内溶液的气相扩散速率，从而控制蛋白质的过饱和度，对蛋白质结晶条件进行优化。

在本章的实验中，通过改变公式 3.1 中微管道长度 L 引起梯度气相扩散，由于每个待结晶液滴距离沉淀剂微池的距离长度不同，所以 L 值是呈阶梯式的，这样导致结晶液滴阵列的气相扩散率（ J ）也是呈梯度分布的，所以反应腔中过饱和速率也相应呈梯度分布，从而实现对蛋白质结晶条件的优化。

3.2.2 芯片结构设计

该梯度气相扩散型蛋白质结晶芯片为单通道结构，由进样口，出样口，一条主管道及分布在管道上的 10 个反应腔组成，每个反应腔之间的链接微管道长度是相同的，如图 3.2（a）所示，使得各反应腔与进样口之间的连接管道长度成比例关系。以该芯片结构模型制作结构化 PDMS 薄膜，将带有微管道结构的 PDMS 薄膜夹持在两层载玻片之间即构成玻璃-PDMS 薄膜-玻璃（G-P-G）夹心式微流控芯片，该芯片与混合式 PDMS-Glass 微流控芯片的 3D 结构示意图如图 3.2 所示。

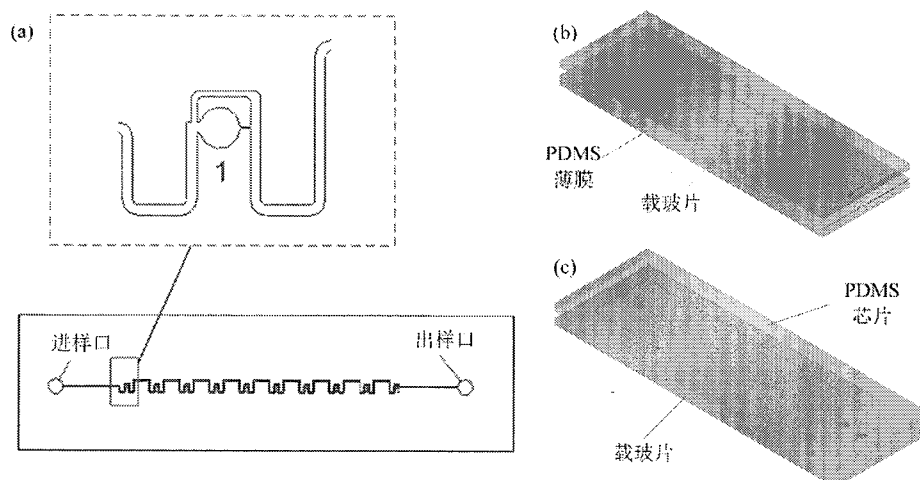


图 3.2 梯度气相扩散型蛋白质结晶芯片示意图：(a) PDMS 薄膜芯片结构微观示意图；(b) G-P-G 夹心式芯片 3D 结构示意图；(c) 传统混合式 P-G 芯片 3D 结构示意图

由于载玻片具有很强的阻隔性能，与 PDMS-Glass (P-G) 微流控芯片相比，将 PDMS 芯片以薄膜的形式夹持在两层载玻片之间既能阻止液体透过 PDMS 芯片上下表面的挥发，也能尽可能的减少液体透过 PDMS 芯片侧面的挥发。G-P-G 芯片对于微流体的驱动力来自于脱气 PDMS 微泵重新溶解吸收空气产生的负压。首先将 PDMS 微泵在 10kPa 的真空箱中保持 1h，取出后在进样口加入样品溶液，将 PDMS 微泵放在出样口处，样品溶液将在 PDMS 微泵产生的负压下进入反应腔；待所有反应腔填满溶液后，加入液体石蜡将各个反应腔分割成独立的互不影响单位，同时防止溶液中的水分通过主管道挥发。

与蛋白质结晶条件优化实验结合，蛋白质与沉淀剂混合液体进样完成后，如果在进样口处密封一定体积的较高浓度沉淀剂溶液，则进样口处沉淀剂与反应腔内混合液体存在一定的浓度差，水分子通过微管道在反应腔与进样口之间进行气相扩散。而由于各反应腔与进样口之间水分子扩散路径长度存在差异，水分子的扩散速率不同，使得各反应腔内蛋白质溶液具有不同过饱和速率。该芯片包含 10 个反应腔，因此利用该芯片做一次结晶实验即可对单个结晶条件的 10 个不同的过饱和速率进行筛选，该方法可用于对蛋白质结晶条件的进一步优化以获得优质蛋白质晶体。

3.2.3 梯度气相扩散型芯片夹心式结构制作工艺

G-P-G 芯片制备工艺流程主要包括结构化 PDMS 薄膜制作工艺及夹心芯片组装工艺两部分，如图 3.3 所示。

PDMS 薄膜的制备：首先将配好的 PDMS 浇注在含有芯片结构的硅片模具上（管道高度约为 86μm），然后将聚酯胶片 (PET) 从硅片的一侧按压覆盖在未固化的 PDMS 上，在按压的过程中要避免 PDMS 产生气泡。放上重物将多余的 PDMS 挤压出去，

放置在 90℃ 热板上加热 1h，使 PDMS 固化。最后将固化好的 PDMS 连同 PET 胶片一起从硅片上剥离下来即得到 PDMS 薄膜，此方法制备的薄膜厚度约为 120 μm 。

夹心结构芯片制备：首先在载玻片上与进出样口对应的位置打孔，然后将附着在胶片上的 PDMS 薄膜和打孔的载玻片一同放到等离子清洗机中进行表面处理(100Pa, 150W 条件下处理 40s)，处理完成后将 PDMS 薄膜有结构的一面与载玻片对准后贴合，用 70℃ 热板加热 10min，保证键合的强度，键合完成后将作为转移层的 PET 胶片从与载玻片键合充分的 PDMS 薄膜上剥离下来。最后在没有结构的 PDMS 薄膜表面浇注少量的 PDMS 预聚体与固化剂混合物，盖上未经任何处理的载玻片，用重物挤压掉尽可能多的未固化 PDMS，放置热板加热固化，制得 G-P-G 夹心式芯片。最后制得的夹心式芯片如图 3.4 所示。

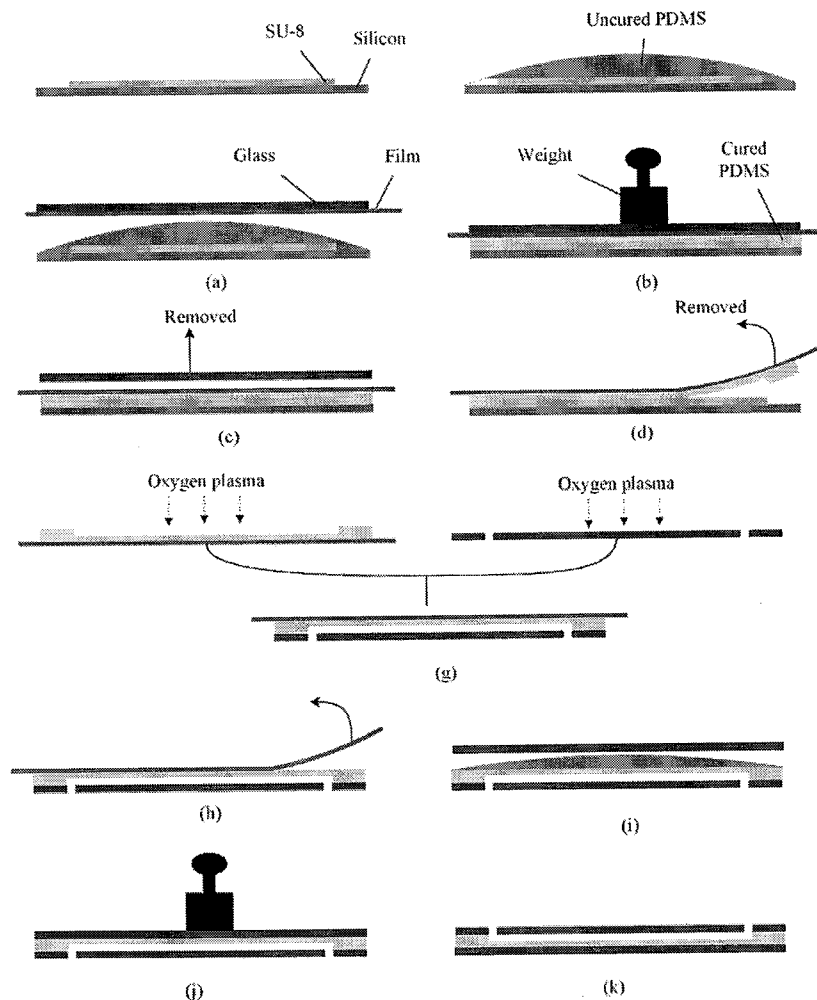


图 3.3 夹心式芯片制备工艺流程示意图

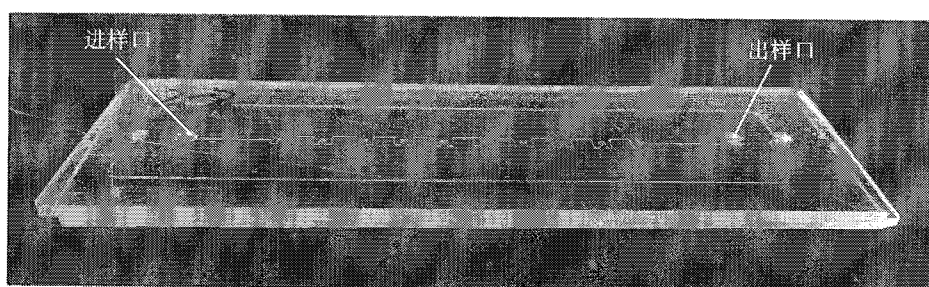


图 3.4 G-P-G 夹心式微流控芯片实物图

3.2.4 结构化 PDMS 薄膜的高效转移

为了验证结构化 PDMS 薄膜的转移高效性，我们用以 PET 为转移层制备 PDMS 薄膜的方法和直接在硅片模具上旋涂大约相同厚度的 PDMS 制备 PDMS 薄膜的方法制备 G-P-G 夹心结构芯片。结果发现，旋涂方法制备的 PDMS 薄膜在从硅片剥离的过程中由于没有支撑，极易破损，而且将剥离的 PDMS 薄膜与玻片贴合的过程中，薄膜容易发生卷曲，管道变形的现象。相反利用 PET 作为转移层的方法则很好的避免了因为薄膜无支撑产生的破损、卷曲及管道变形情况。我们分别尝试以上述两种方法制备 20 个 G-P-G 微流控芯片，其中旋涂方法的成功率为 3/20，而用 PET 作为转移层制备夹心结构芯片的方法的成功率可达 19/20。

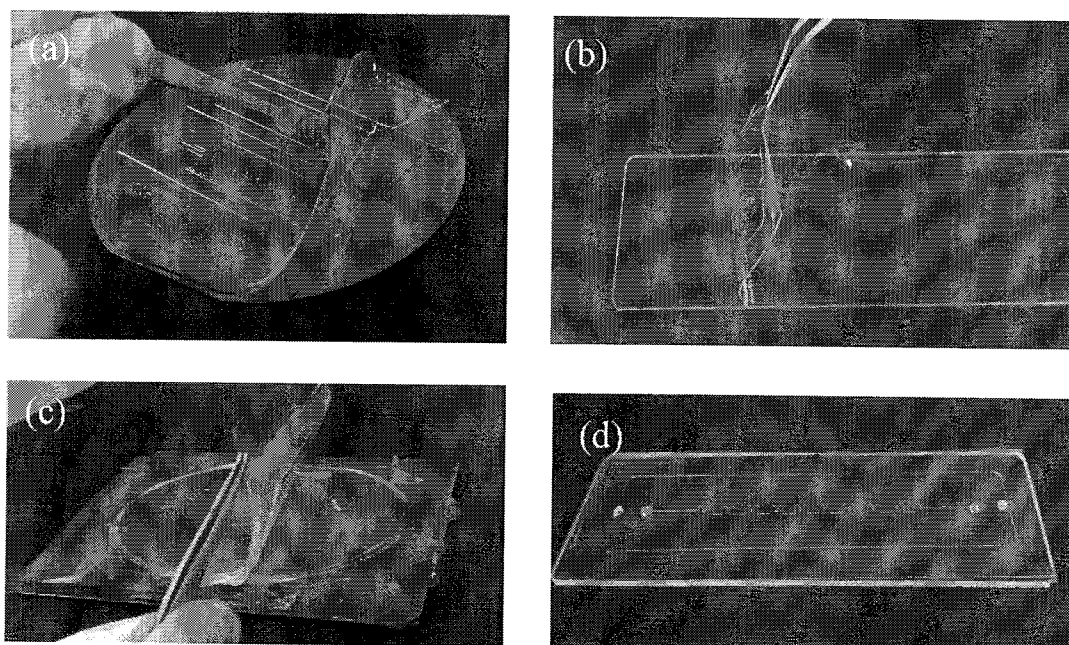


图 3.5 结构化 PDMS 薄膜实物图：(a) 旋涂法获得的 PDMS 薄膜及 (b) 与玻片贴合；(c) 完整附着在 PET 上的 PDMS 薄膜及 (d) 与玻片完整贴合

3.3 芯片抗水分挥发能力测试

3.3.1 实验过程

反应腔内液体环境的稳定是基于微流控芯片的生化反应至关重要的因素,如果反应腔内的液体因为 PDMS 材料的高透气性而挥发过快,就会直接影响反应腔中样本的浓度及混合样本间的反应速率,在蛋白质结晶实验中就会导致蛋白质溶液过饱和率过快,形成微晶或者由于挥发过快,无法形成蛋白质晶体。因此要利用 G-P-G 夹心式芯片尽量避免因为 PDMS 材料导致的液体挥发对芯片中液体反应的影响。

为了评估夹心结构对溶液中水分挥发的抑制功能,本章用蓝色食品色素溶液代替样本溶液,将夹心结构芯片和传统 P-G 结构芯片分别进行实验观察,作为对照。首先将 PDMS 微泵置于真空箱中,在 10kPa 压强下面保持 1h;然后在芯片的进样口处加入蓝色色素溶液,将进行过脱气处理的 PDMS 微泵贴于出样口处,液体在微泵重新溶解气体产生的负压作用下进入芯片管道和反应腔中。待微泵将管道内的液体全部吸出后,在进样口处加入石蜡油,去掉贴在出样口处的微泵,此时样本液体只存留在反应腔中,石蜡油在毛细作用下进入微管道,将反应腔分割成独立的单元。最后密封进出样口后,将两种芯片放入 4℃ 冰箱中,每个 4h 用显微镜观察记录反应腔中液体体积的变化情况。反应腔内液体体积的计算与第二章中液体体积的计算方法相同,利用 Photoshop 图像软件选取该图像中液滴区域,获得该区域所包含的像素数,结合图像分辨率和比例尺计算出液滴图像区域的面积,将此面积值乘以腔体高度(80 μ m)即可获得液滴体积值。

3.3.2 实验结果与讨论

图 3.6 显示了两种形式的芯片反应腔中液体体积的变化曲线,可以看出,经过 24h 实验后, G-P-G 夹心式芯片反应腔中的剩余液体体积约为初始体积的 95%,溶液中的水分减少速率非常缓慢;而传统的 P-G 芯片反应腔中液体只剩下原始体积的 24%左右,水分挥发非常严重,已经不能满足正常反应的需求。通过对比可以看出,与传统 P-G 芯片相比, G-P-G 夹心芯片在减少溶液中水分挥发方面效果十分明显。通过色素溶液实验,芯片的抗水分挥发能力得到验证。

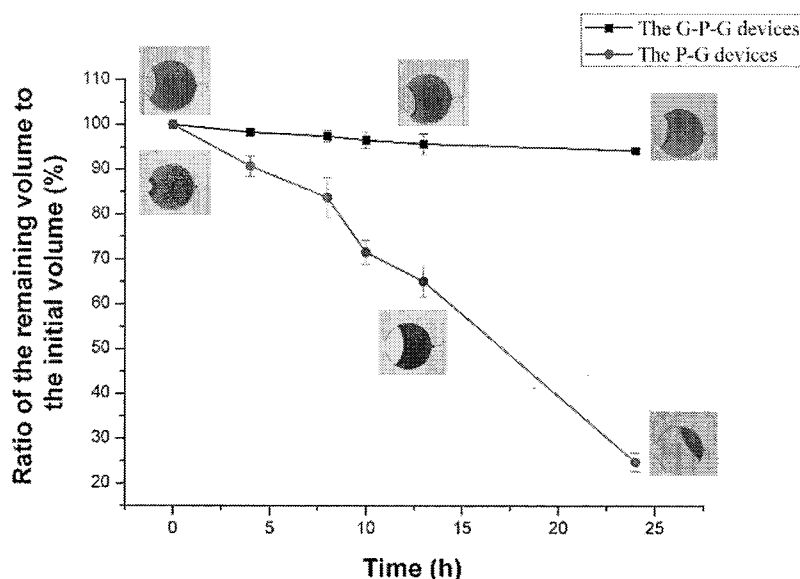


图 3.6 两种芯片反应腔中溶液水分挥发曲线图

3.4 蛋白结晶实验

3.4.1 实验步骤

本节通过溶菌酶结晶实验来实际测试夹心芯片的保湿性能，溶菌酶溶液浓度为 25mg/mL（溶于 2.0 M, pH=4.6 的 NaAc 缓冲液中），沉淀剂为 PEG15（0.2 M 硝酸锂，20% w/v 聚乙二醇 3350）和 A1（0.1 M 柠檬酸钠，0.9 M 氯化钠溶液，pH=3.5），该实验以夹心结构芯片和 P-G 结构芯片作为相互对比。将蛋白质溶液和沉淀剂溶液按 1:1 比例混合后加入进样口，完成样本和油相进样后，将芯片保存在 4℃ 开放环境中，24h 后观测蛋白溶液结晶情况。

3.4.2 结果与讨论

为了进一步评价和验证本文所设计制作的夹心芯片在蛋白质结晶中的实用性，我们以结晶模式蛋白溶菌酶作为实验对象，分别用夹心芯片和传统芯片进行蛋白质结晶测试对比。过饱和度是蛋白质结晶过程的唯一驱动力，如果蛋白质溶液形成过饱和速率过快，往往容易形成大量微晶或有缺陷的晶体，通常情况下，较低的过饱和速率比较适合大体积高质量的单体蛋白质晶体的生长。如图 3.7 所示，对于 PEG 和 A1 两种不同的缓冲剂，夹心芯片中，反应腔内溶液水分挥发速度很慢，蛋白质溶液始终处于一个缓和的过饱和速率环境中，形成了体积较大的单晶；而传统的 P-G 芯片中，溶液水分挥发速率过快，反应腔中蛋白质过饱和速率过大，形成晶体数量众多，但是体积都较小，不适合进行 X 射线衍射分析蛋白质三维结构。G-P-G 夹心芯片有效减少水分

挥发，让蛋白质溶液处于缓慢的过饱和速率中，形成优质单晶，为制备优质蛋白质晶体提供一个可用的方法。

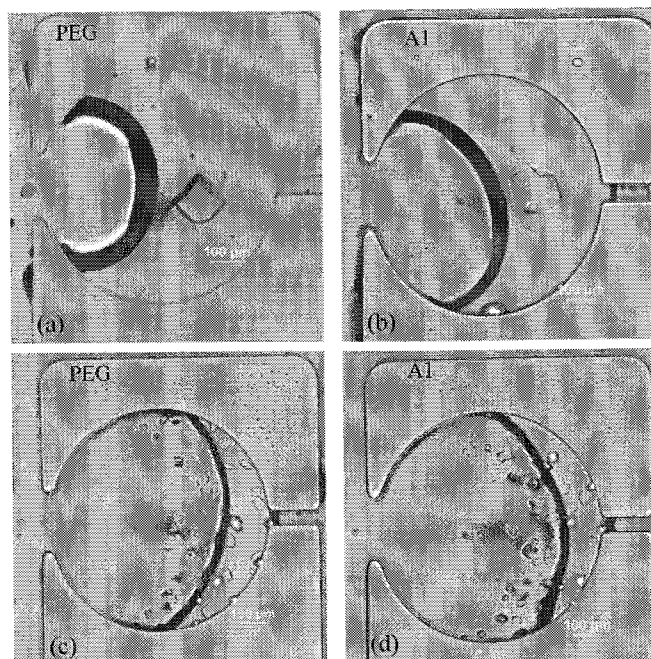


图 3.7 蛋白质结晶结果：(a)(b) PEG 和 A1 分别在夹心芯片反应腔中的单晶；
(c)(d) PEG 和 A1 分别在传统 P-G 芯片反应腔中的小晶体颗粒

3.5 梯度气相扩散型芯片用于蛋白质结晶优化

3.5.1 实验步骤

本节以第二章所述的气相扩散型结晶芯片对蛋白质的结晶条件筛选数据为基础，选取获得大量微晶的沉淀剂条件，利用该梯度气相扩散型结晶芯片对结晶条件进行优化。选取的条件为：溶菌酶溶液浓度为 25mg/mL（溶于 2.0 M，pH=4.6 的 NaAc 缓冲液中），沉淀剂为 PEG15（0.2 M 硝酸锂，20% w/v 聚乙二醇 3350）和 A1（0.1 M 柠檬酸钠，0.9 M 氯化钠溶液，pH=3.5）。将蛋白质溶液和沉淀剂溶液按 1:1 比例混合后加入进样口，完成样本和油相进样后，将出样口密封，在进样口处固定一个沉淀剂储液管，加入沉淀剂溶液，并用石蜡油密封储液管和芯片出样口。将芯片保存在 4℃ 开放环境中，每隔一段时间观测反应腔内蛋白溶液结晶情况。实验装置图如图 3.8 所示：

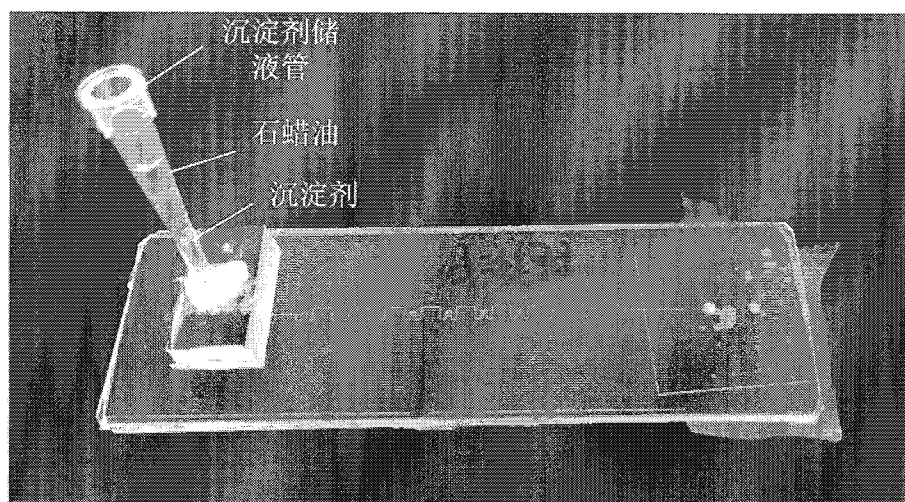


图 3.8 梯度气相扩散型芯片用于蛋白质结晶条件优化的装置

3.5.2 实验结果与讨论

为了进一步评价该梯度气相扩散型芯片在蛋白质结晶条件优化方面的实用性,我们以溶菌酶为实验对象,选取需要进行优化调节的沉淀剂条件进行优化实验。在该芯片中每个反应腔距离沉淀剂储液管的长度 L 是不同的,呈阶梯式,使得在沉淀剂与反应腔内液体浓度差作用下,液体的气相扩散速率 (J) 也呈梯度分布,每个反应腔内的蛋白质溶液具有不同的过饱和度,从而实现对结晶条件的优化。从图 3.9 可以看出,距离沉淀剂储液管越近的反应腔内,液体的气相扩散速率越快,反应腔内液体的体积越少,由于蛋白质溶液的过饱和速率较快,使反应腔内产生大量微晶;而距离沉淀剂储液管越远,反应腔内液体气相扩散的速率也就越低,使得反应腔内的蛋白质溶液缓慢达到过饱和状态,从而形成优质的大颗粒晶体,实现了对蛋白质结晶条件的梯度优化。

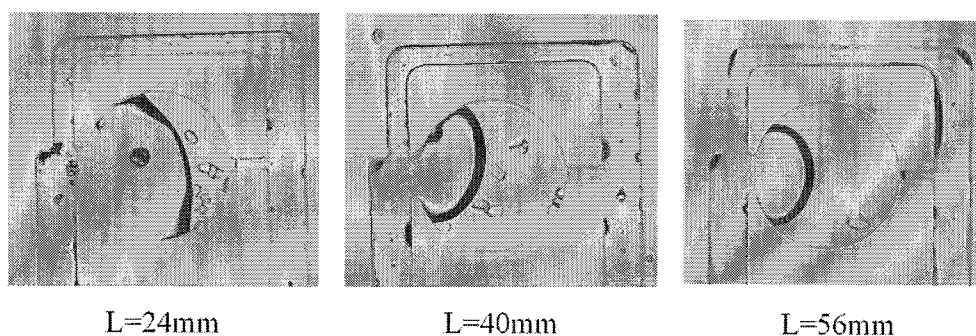


图 3.9 梯度气相扩散型芯片对结晶条件优化结果图

3.6 本章小结

本章以气相扩散型微流控芯片为基础设计了梯度气相扩散微流控芯片用于蛋白

质结晶条件优化研究，并针对 PDMS 材料溶剂挥发的特点利用 PET 胶片作为转移牺牲层制作包含微细结构的 PDMS 薄膜，进一步发展出了“玻璃-PDMS 薄膜-玻璃”夹心结构芯片制作工艺，最后利用夹心结构工艺制作了梯度气相扩散型蛋白质结晶芯片，该芯片不仅发挥了 PDMS 材料的优势，同时又克服了现有的基于 PDMS 的微流控芯片的溶剂挥发问题。将该夹心式芯片应用于蛋白质结晶及结晶条件优化实验中，可以大大减少溶液中水分挥发速率，将蛋白质溶液的过饱和速率控制在较低范围内，实现了大体积优质蛋白质晶体的生长。在结晶条件优化方面，通过反应腔与沉淀剂储液管之间连接管道长度的梯度设计，控制蛋白质溶液的气相扩散速率，使芯片上各反应腔内蛋白质溶液具有不同的过饱和度，实现了蛋白质结晶条件的优化，获得了更加优质的大颗粒晶体。该芯片具有无源微流控芯片的优点，制作工艺简单，无需复杂外部设备，夹心结构防溶液挥发设计为芯片中的蛋白质结晶条件筛选、细胞培养、PCR 等提供了一个有价值的参考，微管道长度梯度设计为蛋白质结晶条件优化研究提供了一个重要的技术平台。

第四章 总结与展望

4.1 工作总结

微流控芯片技术又称微全分析系统,具有微管道网络,实现了从试样处理到检测的整体微型化、自动化、集成化和便携化,大大突破了传统检测技术的局限,它主要以生命科学为主要研究对象,在医药、生命科学、公共卫生等领域发挥着越来越重要的作用。近年来,微流控芯片技术迅速发展,与传统方法,采用基于聚二甲基硅氧烷(PDMS)的微泵微阀技术的无源微流控系统在蛋白质结晶及其筛选领域展现出明显的优势,主要表现在样品消耗量、操作复杂度、结晶条件调控等方面,为蛋白质结晶条件筛选和优化提供了一个重要的技术平台。但是直到目前现有的微流控蛋白质结晶芯片在传统结构生物学实验室中并未得到广泛使用,因此实现简单、实用、接纳度高的微流控蛋白质结晶芯片成为微流控技术继续应用于结构生物学领域的一个重要发展方向。

针对现有微流控蛋白质结晶芯片在实际应用方面的局限性,本文首先以现有的离心式微流控芯片为基础,结合芯片中微管道和微阀门的结构设计,研究了一种可实现气相扩散结晶模式的微流控蛋白质结晶芯片,用于蛋白质结晶条件筛选。实验结果初步证明了该芯片可以利用离心力和毛细微阀作用力完成对样品溶液精确的自动进样控制,实现基于气相扩散结晶模式的蛋白质结晶条件筛选。与传统的悬滴方法相比较,本文研制的气相扩散型蛋白质结晶芯片在结晶条件筛选数量、蛋白质消耗量及结晶筛选速率等方面优于传统结构生物学实验室常使用的悬滴结晶技术。

另外,为了克服现有的以PDMS为材料的微流控结晶芯片存在的溶剂挥发较快的问题以及微流控结晶芯片在蛋白质结晶条件优化调节方面的局限性,本文发展了一种简便高效的“玻璃-PDMS 薄膜-玻璃”夹心式微流控芯片的制作方法,并以此设计制作了用于结晶优化的梯度气相扩散型微流控芯片。与传统PDMS-Glass芯片相比,夹心式芯片可极大降低微流控芯片中溶剂的挥发速率,同时,本文还利用溶菌酶做结晶条件优化实验,实验结果显示,夹心式梯度气相扩散型芯片的低挥发速率能够较好地控制蛋白质溶液形成过饱和速率,梯度式气相扩散能对蛋白质的过饱和度进行优化调节,使其更容易形成优质单晶。

4.2 论文创新

本文就气相扩散型微流控蛋白质结晶芯片及以PDMS为材料的微流控芯片的抗溶剂挥发性做了深入研究,主要的创新点为:将气相扩散结晶方法移植到微流控芯

片上,充分利用 PDMS 芯片微阀门结构进行流体控制,设计制作了气相扩散型微流控蛋白质结晶芯片,且该芯片集成结晶条件浓度优化实时调控功能;发展了一种以 PET 胶片作为转移层的结构化 PDMS 薄膜的简易高效制作方法。

4.3 论文展望

微流控芯片样品消耗量低、高通量、操作简单及快速等优势使其在蛋白质结晶领域得到了重要应用,加快了结构生物学的发展。本文以气相扩散结晶法为基础结合 PDMS 微阀结构设计的微流控芯片在流体操控和蛋白质结晶领域得到了良好的效果,并且具有很好的实用性。本课题在这一时期取得了阶段性成果,但还有很多问题需要进一步的研究:

(1) 进一步实现芯片上蛋白质结晶条件的实时调控优化功能,以获得蛋白质晶体。本文中设计的气相扩散型结晶芯片在 5 种模式蛋白所应的 144 个条件的筛选中展现出了良好的优势,但是有的结晶条件获得的是不利于 X 射线衍射分析的微晶。该芯片可以通过调节进样口处沉淀剂的浓度来控制反应腔内蛋白质过饱和率,以达到对结晶条件进行浓度优化来获得优质单晶的目的,本文中的浓度优化实验初步验证了调节的可行性,在今后的工作中尝试从对进样口处沉淀剂的浓度调节比例以及介入浓度调节的时间做一系列的研究,逐渐改进芯片结构,实现对蛋白质结晶条件的优化。

(2) 进一步改进和优化蛋白质结晶芯片系统,构建完整的蛋白质结晶条件筛选平台。本文中的蛋白质结晶芯片在实验中采用的是五种模式蛋白质,在今后的工作中尝试其他种类的蛋白质,尤其是在膜蛋白的结晶方面取得进展。

(3) 玻璃-PDMS 薄膜-玻璃夹心式芯片的防溶剂挥发性能在色素和溶菌酶结晶条件筛选中取得了较好的结果,在今后的工作中尝试更多的蛋白质及结晶条件的组合,另外扩展夹心芯片的应用,如在 PCR 实验中抗挥发性能有待进一步验证。在结晶条件优化方面应进一步改进芯片结构,减少出样口密封不够对气相扩散速率的影响。