

haloalkanes and haloalkenes. Being one of the proteins containing binuclear iron centers, MMO can activate oxygen for insertion into a C-H bond. The elucidation of structures of active centers of MMO is significant for methane utilization and design of chemical catalysts.

This article will concentrate on progress on above researches.

Key words methane monooxygenase, methanotroph, catalytical performance, binuclear iron center

毛细管无胶筛分电泳*

郭 栩 薛 俊 张 岩 林炳承**

(中国科学院大连化学物理研究所, 大连 116012)

摘要 围绕着毛细管无胶筛分电泳的介质和机理, 概括介绍了近年来这种技术在各个方面的发展, 及其在 DNA 片段的分离、PCR 扩增产物的检测和蛋白质分子量的测定等方面的应用前景。

关键词 无胶筛分电泳, 线性聚合物, DNA 片段, PCR 扩增产物, 蛋白质

高效毛细管电泳 (HPCE) 作为一种极其重要的分离分析方法, 已引起生命科学各领域以及相关学科的极大重视, 并在生化分析, 临床医学和环境食品等领域得以广泛的应用。特别是近几年来, HPCE 的发展显示了其在多肽、蛋白质 (包括酶、抗体)、核酸的分离分析以及 DNA 测序方面的巨大潜力。

由于核酸片段、SDS-蛋白质的质量和电荷比值近似相等, 对它们的分离一般均使用毛细管筛分电泳。毛细管筛分电泳, 包括毛细管凝胶电泳 (CGE) 和毛细管无胶筛分电泳 (NGS) 两类, 均以样品分子大小为分离基础。

在毛细管筛分电泳中, 凝胶电泳发展较早。在 1983 年, Hjerten^[1]就首次将传统凝胶电泳技术中的聚丙烯酰胺凝胶装入内径为 150 μm 的玻璃毛细管中, 以消除毛细管内壁对蛋白质的吸附, 并利用这些方法对多种蛋白质进行分离^[1,2]。取得了很好的分离效果。

1987 年, Cohen 和 Karger^[3]使用了内径 100 μm 以下的弹性石英毛细管, 用同管内壁交联的方法制备凝胶柱, 分离了蛋白质、DNA 片段和寡聚核苷酸。1990 年, Lux 和 Xin 等^[4]

提出了用线性聚丙烯酰胺对柱内表面预处理和用 γ 射线引发聚合的方法, 在分离 DNA 片段和寡聚核苷酸时取得了极高的效率。以后, 我们实验室也在 CGE 柱的制备和应用工作方面做了很多尝试^[5]。

由于凝胶毛细管柱制备困难, 寿命短, 进样端易堵, 许多人开始探索使用低交联或无交联的聚丙烯酰胺柱。Cohen 等人用 9%~12% 浓度的线性聚丙烯酰胺分离 DNA 片段, 效果较为理想。1989 年, Zhu^[6]提出在 CE 缓冲液中加入纤维素衍生物, 他以甲基纤维素为筛分介质对 DNA 片段做了很好的分离, 在蛋白质的分离和分子量的测定方面也取得了初步的结果 (图 1)。现在, 一般将这种在电解质溶液中加入水溶性高分子聚合物的溶液体系, 称为无胶筛分电泳 (non-gel sieving, NGS) 体系。

NGS 体系同时具有抗电渗流和筛分的作用, 它柱效较高, 且易于制备。目前已被逐步应用于低聚核苷酸、DNA 限制性片段、聚合酶

* 国家自然科学基金资助项目。

** 通讯联系人。

收稿日期: 1994-09-15, 修回日期: 1995-01-16

链反应产物的分离研究领域,也正在向蛋白质的分离领域扩展。

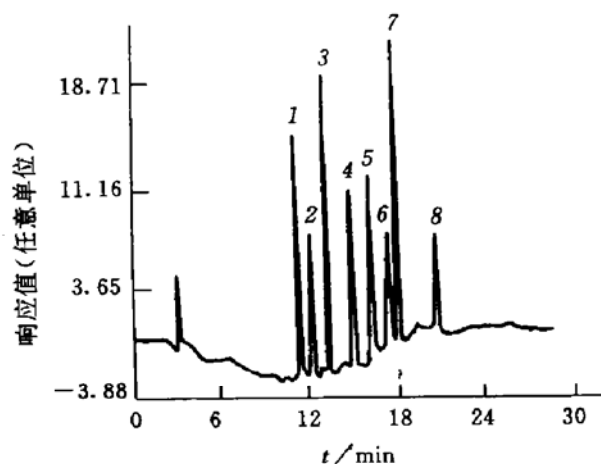


图1 标准蛋白质的SDS-NGS分析

1: 溶菌酶 ($M_r=14\ 400$); 2: 胰蛋白酶抑制物 ($M_r=21\ 500$); 3: 羧酸脱氢酶 ($M_r=31\ 000$); 4: 卵清蛋白 ($M_r=45\ 000$); 5: 血清清蛋白 ($M_r=66\ 200$); 6: 磷酸化酶 B ($M_r=97\ 400$); 7: β -乳糖苷酶 ($M_r=116\ 250$); 8: 肌球蛋白 ($M_r=200\ 000$).

在表1中,我们以平板电泳、毛细管凝胶电泳为参照说明无胶筛分电泳的特点。

表1 不同类型的筛分电泳比较

分 类	传统平板电泳	毛细管凝胶电泳	无胶筛分电泳
分离原理	分子大小	分子大小	分子大小
分离介质	凝胶	凝胶	线性聚合物
塔板数	10^5	10^7	4×10^6
定量	难	易	易
重复性	差	差	好
制备	一般	难	易
操作	难自动化	易自动化	易自动化

1 筛分介质

NGS是由线性高分子聚合物的水溶液所形成的分离体系。根据CE的特点,选择筛分剂时应考虑粘度、水溶性、紫外吸收等因素。目前较为常用的线性高分子聚合物是线性聚丙烯

酰胺、纤维素衍生物、葡聚糖、聚乙二醇等。

1.1 线性聚丙烯酰胺

线性聚丙烯酰胺 (linear polyacrylamide, LPA) 由丙烯酰胺 (acrylamide, Acr) 和甲撑双丙烯酰胺 (Bis) 聚合而成,前者被称为聚合单体,后者被称为交联剂。聚合反应是在一些能提供游离基的催化-氧化还原系统中完成的。

Hjerten^[7]曾提出 T 、 C 两个参数,用以分别表示单体的总百分比浓度和交联度,其中:

$$T = \frac{a+b}{m} \times 100\%, C = \frac{b}{a+b} \times 100\%$$

式中: a : Acr 的量 (g), b : Bis 的量 (g), m : 缓冲液的体积 (ml)。可以通过控制 T 、 C 的多少,改变凝胶的孔径大小,从而对被分离组分起到筛分的作用。

Kasper^[8]已证明了用 PA 分离单链 DNA (7.5% T , 3.3% C , 7mol/L 尿素) 和双链 DNA (3% T , 5% C) 的可能,但由于无气泡的凝胶柱难以制备,柱寿命短,Heiger 等^[9]于1990年开始用低交联和非交联的方法制备分离柱,他们发现当 C 从5%降至0.5%时,对DNA片段的分离效果极好,于是采用了非交联的方法 (3%~14% T) 制备线性聚丙烯酰胺柱,并发现随着 T 增加,筛分能力增加,而且由于孔径较大,非交联柱在DNA片段的应用上有更宽的分子量范围。

一些人在比较1.5%~6% T 等不同浓度

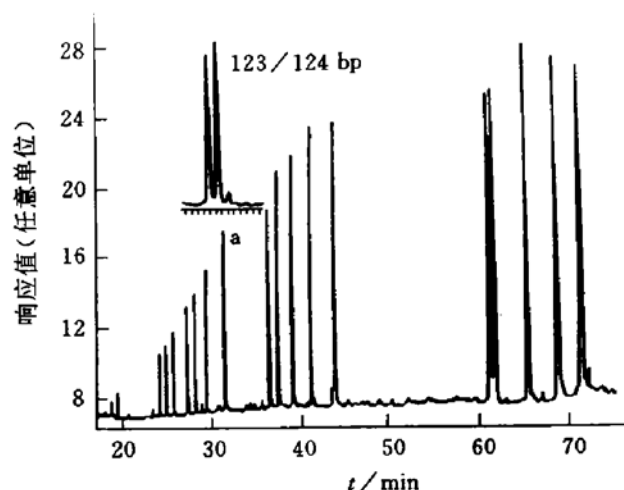


图2 322/Hae III 样品 (18~589 bp) NGS 电泳图

的 LPA 后, 发现 6% T 的分辨率最佳, 并且在 DNA 诱变剂 EtBr 盐的存在下可将 123 bp/124 bp 片段分离 (图 2)^[10]. 这可能是由于在 LPA 的聚合过程中产生了不同链长和孔径的分布, 从而形成一系列孔径梯度, 因而它将优于分子量分布较窄的聚合物形成的分离系统.

最初分离蛋白质是用 SDS-PAGE 交联系统. 目前, 已经证实用 LPA 分离 SDS-蛋白质的可能性^[11], 其分离结果至少与平板电泳技术一致.

LPA 作为筛分介质分离范围广, 分辨率高, 但制备时需经聚合反应, 条件要求高, 重复性差.

1.2 纤维素衍生物

纤维素衍生物是纤维素分子的羟基取代物. 纤维素分子是以无水葡萄糖甙为基本结构单元组成主链的线性大分子. 每个结构单元上有三个可取代的羟基, 当被甲氧基、乙氧基等取代后即得到性质不同的纤维素衍生物.

纤维素衍生物是分子量可上万的高分子聚合物. 它的化学性质稳定, 其主链结构在苛刻的条件下才可断裂, 它的水溶性与取代基种类、分子量大小及取代度有关. 目前, 在无胶筛分电泳中, 经常使用甲基纤维素 (MC)、羟乙基纤维素 (HEC)、羟丙基甲基纤维素 (HPMC) 等作为分离介质. 当这些聚合物溶于水后, 在浓度较低时, 聚合物链是孤立的, 在浓度较高时, 则发生交叠, 而它们所形成的类似于凝胶的孔结构可对 DNA 片段进行筛分. 一般认为聚合物浓度愈大, 孔径愈小, 筛分效果愈好. 而其孔径可从理论上进行预测, 例如: 0.4% HEC 孔径为 26.5 nm^[12]. 已经有人用 0.47% 浓度的 HPMC (15 000 cp 2%) 分离 564 ~ 23 130 bp 片段, 分离效果很好^[13]. 在 EtBr 盐的存在下, 用 0.5% MC (4 000 cp 2%) 可分离相差 10 个 bp 的 DNA 片段^[14].

由于纤维素衍生物种类多, 分子量各异, 可针对不同大小的 DNA 片段择优选用. 而且由于它操作简单, 化学性质稳定, 正愈来愈受到广泛的重视.

1.3 葡聚糖^[15]

葡聚糖 (右旋糖甙), 是由某些细菌合成的胞外多糖, 此多糖高聚物基本上是由 D-葡萄糖吡喃糖残基组成, 并带有侧链. 葡聚糖与 LPA 不同, 有低的紫外吸收, 用葡聚糖作筛分介质可提高对蛋白质的检测灵敏度. 但目前还没有见到用这种材料分离 DNA 片段的报道.

1.4 聚乙二醇 (PEG)

聚乙二醇是环氧乙烷聚合体的总称, 其性质随分子量的不同而有差异. PEG 是线性聚合物, 溶于水可成为聚合物溶液. 文献 [6] 报道用浓度为 3% 的 PEG ($M_r=100\ 000$) 可分离 SDS-蛋白质 ($M_r=14\ 000\sim94\ 000$).

2 筛分机理

作为一种由高分子聚合物水溶液构成的筛分体系, 影响样品分子分离的因素很多, 其中包括聚合物种类, 链长及浓度等. 目前, 经常被文献引用的是交缠溶液理论^[12].

在交缠溶液理论中, Grossman 根据溶液浓度的不同将高分子溶液分成三类 (图 3).

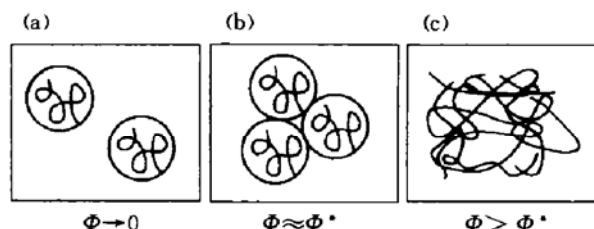


图 3 不同浓度溶液的状态示意图

(a) 稀释溶液; (b) 临界交缠溶液; (c) 交缠溶液.

图 3 中 Φ 表示溶液浓度, Φ^* 被称为临界交缠浓度. 当 $\Phi < \Phi^*$ 时, 聚合物链处于流动状态, 彼此之间没有相互作用; 当 $\Phi > \Phi^*$, 聚合物链发生交叠, 产生分子间的相互作用, 一般称这个状态的溶液为交缠溶液.

在一定浓度的聚合物溶液中, 高分子链形成的孔径有确定的大小. de Gennes 假设: a. 当 $\Phi > \Phi^*$ 时, 孔径 (ξ) 只与聚合物浓度有关而与链长无关; b. 当 $\Phi = \Phi^*$ 时, 筛孔径与每个孤立聚合物线团半径相当, 筛孔径可表示为:

$$\xi(\Phi) \approx a\Phi^{-0.75} \quad (\Phi^* < \Phi < 1) \quad \dots\dots(1)$$

其中 a 为聚合物链的单元长度, 从式 (1) 可知当 Φ 增大时, 孔径变小. 为了确保获得小的孔径, 同时使聚合物溶液粘度不至于太高, 一般取其在临界值时的浓度, 即:

$$\xi(\Phi^*) \approx aN^{0.6} \quad \dots\dots\dots(2)$$

由上式可知, 为获得大的孔径, 应选择长的聚合物链. 这对于优化筛分剂条件有着非常重要的意义.

Grossman 等人^[12]根据上述理论, 考察了 HEC 的临界浓度, 基本上与理论预测相符. 他还提出 5~10 nm 的孔径适合于分离单链聚核苷酸, 30 nm 或更大的孔径用于分离大的双链 DNA 片段. 根据这一观点, 当聚合物浓度大于 Φ^* , 即成为交缠溶液后才会对样品进行筛分. 但实验结果表明, HEC 浓度在低于其临界交缠值时, 仍会对 DNA 片段有相当的分离能力. Grossman 对此解释为由于高分子聚合物分子量的不均匀分布, 一部分大分子链在低浓度时仍可发生交缠作用. 也有人认为这是聚合物分子与 DNA 链的偶合作用的缘故^[16].

总的说来, 无胶筛分电泳是介于 CZE、CGE 之间的一种分离体系. 由于聚合物溶液本身的特殊性, 使样品分子在通过动态孔径时, 有时以正常淌度迁移, 有时受到阻碍“挤”过筛孔, 从而完成分离过程. 因此, 无胶筛分机理比较复杂, 更加完善的理论有待于进一步研究.

3 无胶筛分的应用前景

NGS 的抗电渗流和分子筛作用的特点有利于大分子物质的分离. 目前主要用于 DNA 内切片段分离, PCR 扩增产物的检测及蛋白质的分子量测定等方面.

3.1 DNA 内切片段

DNA 序列分析是生物化学中最重要的分析技术. 它的机理是利用限制性内切酶在 DNA 链上的特定碱基位置切割, 对切割片段进行分离分析, 从而推导出碱基顺序. NGS 应用于 DNA 序列分析具有速度快、分辨率高、能在线检测和易于自动化等特点.

在 EtBr 盐的存在下, 用 LPA 作分离介质可对相差一个 bp 的片段进行分离, 分离范围可达 23 000 bp. 有人已在 LPA 体系中, 利用单束激光两个光电倍增管, 在 30 min 内准确获知 350 bp 序列信息^[17]. 可以预期, NGS 在 DNA 内切图谱分析、诊断、临床和法医检验中, 将会起到愈来愈重要的作用.

3.2 PCR 扩增产物分析

最近几年来兴起的聚合酶链反应(PCR)技术是基因扩增技术的一次重大革新^[18], 在对 DNA 或 RNA 进行体外特异性扩增方面显示了突出的功效, 已经被用于体内各种病毒的核酸测定. 传统的 PCR 扩增产物的检测常用平板电泳, 放射自显影方法等, 不仅费时, 而且对人体有潜在的危害^[19], 因此在一定程度上影响了 PCR 技术的推广. 而 NGS 以高效、快速、易定量等特点, 被认为有可能在很大范围内取代传统电泳的一种技术, 而且极有可能与 PCR 技术联用. Zhu^[6]在这一领域做了很多的工作, Schwatz 等人^[19]已对 AIDS 病毒的 PCR 扩增产物进行了测定. 我们实验室用这一方法对乙肝病毒的 PCR 扩增产物进行检测, 取得了较为满意的效果 (图 4)^[20]

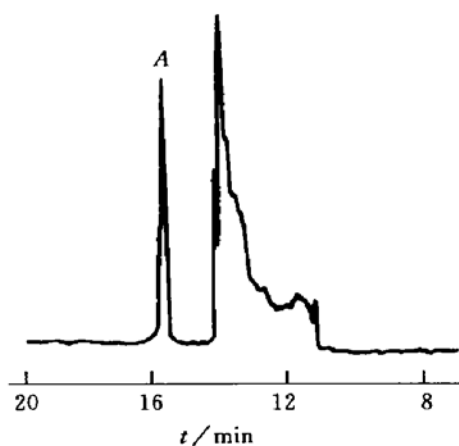


图 4 PCR 扩增产物的 NGS 电泳图
其中峰 A 是乙肝病毒的 PCR 扩增产物.

3.3 蛋白质分离和分子量测定

用 NGS 分离提纯蛋白质的同时还可以提供蛋白质分子量这一物理参数.

用电泳的方法测定蛋白质的分子量, 一般

须在缓冲液中加入一定浓度的 SDS. SDS 与蛋白质的结合既掩盖了不同种类蛋白质原有的电荷差异, 又改变了蛋白质的分子构象, 使其大小与蛋白质的分子量呈正比. 因此, 在筛分介质中, SDS-蛋白质复合物可以其大小分离, 从而做出分子量标准曲线.

SDS-蛋白质复合物的分子量通常比核酸分子小, 一般应选用筛分孔径较小的分离介质. 在平板电泳中, 常使用聚丙烯酰胺凝胶, 琼脂糖凝胶, 但这种技术同样面临着制备、重复性、检测、定量等问题. 在 NGS 系统中, LPA 在小于 260 nm 时有强烈的紫外吸收, 灵敏度损失近 50 倍之多, 因此文献中均选用葡聚糖, 聚乙二醇等低紫外吸收的聚合物. 在 214 nm 检测时, 可达到 5 mg/L 浓度的灵敏度, 其绝对量不超过 10 nl, 已大大超过用于 PA 凝胶电泳的考马斯亮蓝染色技术.

朱明德等(见: 1993 年第一届全国毛细管电泳报告会文集)用此方法已推算出腹水样品中单克隆抗体 IgG1 的分子量范围, 我们实验室也在这方面取得了初步的进展.

4 无胶筛分技术存在的问题

无胶筛分技术是 90 年代出现的毛细管电泳技术的一个分支, 尽管它发展迅速, 但由于时间短促, 仍存在许多亟待解决的问题. 目前各实验室的工作只集中在不同筛分体系的选择和应用上, 而未对无胶筛分理论作深入的探讨, 因此在实际应用中难以对筛分体系的选择做出指导. 另外, 我们的研究表明, 由于分离环境为碱性(pH=8~9), 柱的改性因素对分离效果有较大影响, 而且改性柱的寿命也存在一定的问题, 所有这些将有待于进一步的研究.

参 考 文 献

- 1 Hjerten S. J Chromotogr, 1983; 270: 1
- 2 Hjerten S, Zhu M. J Chromatogr, 1985; 327: 157

- 3 Cohen A S, Karger B L. J Chromatogr, 1987; 397: 409
- 4 Yin H Y, Lux J A, Schomburg G. J HRC, 1990; 13: 624
- 5 林炳承, 许 旭. 科学通报, 1994; 39 (13): 2193
- 6 Zhu M D, Hansen D L, Burd S *et al.* J Chromatogr, 1989; 480: 311
- 7 Hjerten S. Arch Biochem Biophys Suppl, 1962; 1: 147
- 8 Kasper T J. J Chromatogr, 1988; 458: 303
- 9 Heiger O N, Cohen A S, Kerger B L. J Chromatogr, 1990; 516: 33
- 10 Parlat Y F, Berka J. J Chromatogr, 1993; 652: 57
- 11 Ganzlor K, Greve K S. Anal Chem, 1992; 64: 2665
- 12 Grossman P D, Soane D S. Biopolymers, 1991; 31: 1221
- 13 Chan K C, Whang C W. J Liq Chromatogr, 1993; 16 (9810): 1941
- 14 Mcgreger D A. J Chromatogr, 1993; 652: 67
- 15 McCord B R, Rony C, Debene P L *et al.* J Chromatogr, 1993; 652: 75
- 16 Barron A E. J Chromatogr, 1993; 652: 3
- 17 Marie C, Gesteland R, Field M J *et al.* Anal Chem, 1993; 65: 2851
- 18 吴 明. 生物化学与生物物理进展, 1990; 17 (4): 251
- 19 Schwartz H E, Klfelder K. J Chromatogr, 1991; 559: 267
- 20 林炳承, 刁海燕, 张 岩等. 分析化学, 1994; 22 (5): 449

Capillary Non-Gel Sieving Electrophoresis.

Guo Xu, Xue Jun, Zhang Yan, Lin Bingcheng (Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116012, China).

Abstract The sieving medium and separation mechanism of capillary non-gel sieving electrophoresis technology were reviewed. The application in the field of DNA fragments separation, PCR-amplified products detection and protein molecular weight determination etc. was introduced.

Key words non-gel sieving electrophoresis, linear polymer, DNA fragment, PCR-amplified products, protein