

高效毛细管电泳的发展

林炳承

(中国科学院大连化学物理研究所,大连 116012)

提 要

高效毛细管电泳,作为90年代最重要的分析仪器之一,已引起国内外有关领域人士的极大关注,拟结合研究和应用过程中的体会,从理论、技术和应用等方面对这一技术作一概述。

关键词 毛细管电泳,柱制备,生物技术,酶,抗体。

高效毛细管电泳的迅速发展是80年代后期分析界的一件大事,不少人预期它将会成为90年代最有影响的分离分析手段之一,它在现阶段的发展兼有60年代的气相色谱从填充柱发展到高效毛细管,70年代液相色谱由相对单一的液液分配和吸附色谱发展到离子交换、亲和等多种模式,即在短短的几年内,迅速地从经典电泳发展到最高柱效可达 10^6 理论板数,最高检测灵敏度可达 10^{-19} mol,拥有区带电泳、电动力学色谱、凝胶电泳、等电聚焦等多种形式的综合性分析技术。它采用500—1000V/cm的高电场提高组分的迁移速度,而又用极细的毛细管克服由高电场产生的焦耳热和径向温差,保证系统的高分离效率。尽管整个说来,大规模的研究在世界范围内刚刚开始,但是它在对肽、蛋白质(包括酶、抗体)的分离分析、DNA的图表示和序列测定等一些重要的生物化学和分子生物学领域的作用和地位已基本确定,进一步的应用领域正在开拓^[1,2]。

刚刚结束的第三届国际毛细管电泳会上,美国加州贝克莱分校的Charles作了第一个大会报告,题目是:“人类基因工程的新技术要求”,阐述毛细管电泳在基因工程研究中的地位。在头一天的大会报告中,很大一部分内容涉及到DNA的序列测定,比如“DNA序列

测定的单分子检测方法”“高速DNA序列测定”等,显然这样一种在生命科学领域中极其重要的应用背景推动了这种技术的迅速发展。1989—1991年连续三届国际毛细管电泳会的另一个特点是它已吸引了越来越多的色谱学者的参与,这样一种现象是基于下述事实:即作为一种分离分析手段,电泳,特别是毛细管电泳,和色谱无论在理论、技术和功能上都有极其明显的相似之处。下面就高效毛细管电泳在上述三个方面的发展以及它的一些主要参数作一概述。

1 理 论

Giddings早在1969年就提出描述电泳和色谱过程的偏微分方程具有很大的类同性^[3],就区带电泳和色谱来说两者都包含有扩散和随动过程,当然后者的方程中多了一个分配项;而在电动力学色谱中,这个分配项也同样存在,只是要考虑“固定相”本身的运动。毛细管电泳的主要特点之一在于要考虑由焦耳热引起的径向温度梯度^[4-6],这个温度梯度是引起谱带展宽的主要原因,而在高电场作用下,其数值将不允许忽视。细管径毛细管的主要作用是尽可能地

减小这个梯度, Knox 和 Grushka 等最近发表的一个结论是: 如果管子的直径能满足下述方程, 那么自身产生的热量就不会引起太严重的谱带展宽和效率损失^[5]。

$$E \cdot d \cdot (C)^{\frac{1}{2}} < 1500$$

这儿 E 是电场强度, 单位 KV/m, C 是介质浓度单位 mol/L, d 为管径, 单位 μm , 在 $E = 50$ KV/m, $C = 0.01$ mol/L 这样的常规条件下, 所求得的 d 值必须小于 $140 \mu\text{m}$, 实验结果表明, 此值还略大一些, 因此以 $100-50 \mu\text{m}$ 为宜。当然近来的理论研究表明还有一种既采用较大管径而又仍然保持高柱效的办法, 即降低缓冲液的浓度^[6], 缓冲液浓度降低使粘度降低, 速度加快, 保留减小, 更重要的是浓度的减小会使温度降低同样的倍数, 即使在管径较大的柱子内 (内径为 $125 \mu\text{m}$) ΔT 也仍只有 1.2°C , 因此有可能在不降低效率的前提下采用内径较大的柱子。当然这样会带来相应的问题, 其中之一是要求样品浓度作相应的降低, 随之而来的是对检测器提出更高的要求。整个看来, 关于毛细管电泳理论研究的文章还不多, 我们实验室已有人着手开展这一方面的工作^[7]。

2 柱 技 术

如同柱子是色谱的心脏一样, 毛细管柱也是毛细管电泳的心脏。有关柱子的研究是当前毛细管电泳技术研究的热点之一^[2,8,9], 目前商用毛细管有两类, 一类是管壁没有处理的, 另一类是处理的。在 $\text{pH} > 3$ 时, 在毛细管管壁上的硅醇电离, 产生负电, 因此带来了两个问题, 一是电渗流。另一个是吸附, 电渗流是由贴近管壁的电介质阳离子和管壁中硅羟基所带的负电荷之间的偶电层形成, 其速度是泳流的若干倍, 并且易变, 吸附则是由蛋白质表面的阳离子基团和电离的硅羟基的键合引起。两种现象均能严重地影响毛细管电泳分析在定性和定量上的重复性。对管壁进行处理是克服这两种现象的有效途径。现有的处理方法有好多种, 一种是先加 γ -甲基丙烯羟基丙酯三甲氧基硅烷, 使之与管壁进行共价连接, 然后加入四甲基乙二胺

和丙烯酰胺, 在管子表面形成单分子层, 另一种是用吡咯烷酮代替丙烯酰胺, 还有一种是采用磷酸盐, 磷酸盐在气相色谱中曾用来作为管子表面的湿润剂或减尾剂, 可使活性吸附中心饱和, 在电泳中采用这种办法也可屏蔽吸附点, 减小电渗, 但是它只能在低 pH 下使用, 最近 Regnier 等提出了在酸性条件下为正的聚乙烯胺键合相涂料和非离子型的聚环氧树脂涂料, 并指出为完全消除电渗流的影响, 涂层厚度必须大于 30 \AA 。在 1991 年的第三届国际毛细管会上有不少实验室介绍了新的脱活技术。我们实验室已经成功地研制了两种不同的电泳毛细管柱, 并以肽、蛋白、酶和抗体为对象作了多方面的应用^[10]。

3 检 测 器

检测器的问题也是毛细管电泳技术发展上的一个重要部分, 其中的技术关键是如何通过这么细的毛细管取得信号。毛细管直径非常小, 溶质通过时所产生的区带的体积也极小, 如果是柱外检测, 主要困难来自于如何把极细的管子接在一起, 通常情况下它会扰乱管内的流动使谱带展宽, 影响分离。若是采用柱内检测, 则考虑到其无论是从通道的长度还是体积来说都远远小于液相色谱, 采用增加前后石英聚焦镜的办法看来比较有效, 相比之下, 荧光检测在技术上更容易一些, 但是被检测化合物的范围却要窄得多。目前正在研究的有激光-荧光检测、二极管阵列、电泳-质谱联用等。如果毛细管电泳-质谱联用能够成为常规手段, 那么将使毛细管电泳的使用价值有极大的发展。因为随着谱图里峰数目的增加, 鉴定问题就将成为极其重要的了。类似的问题在毛细管气相色谱里就是通过色-质联用解决的。电泳-质谱联用有点类似于液相色谱-质谱联用, 就分析范围而言两者相当, 它们的流动相也相似。当然, 电泳通常是用电介质溶液, 目前的研究表明, 只要电离程度足够小, 毛细管电泳这样小的流出量对于设计界面器来说不会带来特别的困难, 事实上可能还要更方便些。

4 几种操作模式

4.1 毛细管区带电泳 (CZE) 这是毛细管电泳中最基本的一种操作模式, 离子或能被解离的分子进入充满有电介质的毛细管后在电场的作用下按一定的速度朝一定方向迁移, 造成电泳流, 泳流的速度视 Zeta 势和带电粒子介电常数的不同而不同, 当然也和电场强度及介质的粘度有关。

与电泳同时在毛细管内存在的另一种现象是缓冲液相对于毛细管壁的移动, 通常称之为电渗, 如前所述, 因含硅羟基而带有负电荷的管壁在 $\text{pH} > 3$ 时, 会使管中贴近内壁的缓冲液感应出一层正电, 从而在管壁上形成一个偶电层, 管中的液体在被电场诱导后形成向负极移动的渗流, 带电粒子在毛细管内的实际运动速度是上述泳流和渗流速度的矢量和, 在正常情况下后者是前者的 5—7 倍, 因此, 所有的组分均向负极移动, 其中正离子迁移速度最快, 中性粒子次之, 负离子最慢。

4.2 毛细管电动力学色谱 (MECC) 众所周知, 毛细管电动力学色谱采用未涂渍的毛细管柱, 加之类似于 SDS 这一类表面活性剂和缓冲液, 由此来促进中性粒子的分离^[10,11]。对它的研究也大体围绕着上述三个组成部分展开。尽管一般认为在 MECC 中粒子的运动主要依靠电渗作用, 因此采用未涂渍的柱子, 但已有人采用处理过的柱子来作分离^[12], 比如用 OV-101 和 PEG-20M 这样典型的毛细管气相色谱固定相后会使电渗加大, 迁移速度加快, 流出时间缩短。而在极性固定相上, 组分的迁移速度减慢, 出峰时间延长。第二个方面是表面活性剂, 对不同类型浓度的表面活性剂的研究已做过不少工作, 最近报道, 在 SDS 中加入别的一些物质, 比如四烷基胺盐 (TAA) 可显著地改善离子化合物的分离, 而倘若加入少量手性试剂, 比如 L-氨基酸残基或 β -环糊精, 则可与 SDS 组成复合胶束, 改变其和对映体衍生物的亲合力, 从而进行手性分离, 因此提供了一个新的手段来确定胶束的对映体选择性。第三

类工作是在缓冲液中加入一些试剂, 比如说甲醇或乙腈, 实际上即是沿用传统液相色谱的办法以获得更大的选择性, 因此从另一个方面展示了这种技术的潜力。

4.3 等电聚焦 (IEF) 等电聚焦是利用某些两性电介质的支持物在电场中形成 pH 梯度, 使具有两性电介质性质的蛋白质样品在与它们的等电点相应的 pH 区域集中来达到分离的目的, 毛细管等电聚焦则是把这个过程移到毛细管柱内进行, 等电聚焦宜在涂渍的毛细管柱上进行, 电渗流一大就会干扰 pH 梯度和聚焦蛋白区带的获得, 现有的等电聚焦技术在一些方面还欠完善, 比如在聚焦过程中落在柱尾的蛋白质不易被检测, 而聚焦在前端的蛋白质迁移效率低, 因此使峰变宽或者甚至无法被检测。另外样品中若有盐存在会改变聚焦时的 pH 分布, 增加聚焦和移动所需要的时间, 最近 Bio-Rad 的朱等人作了一个很好的工作, 集中解决这一问题^[13], 其中包括: (a) 把一种碱性化合物加到两性电介质和样品混合物中, 这样就在检测窗口和末端之间加上一个塞子, 阻止碱性强的蛋白质在聚焦时流入这一区域, (b) 使用一种低等电点的两性电介质作移动剂, 增加梯度酸性段的移动效率, 改变酸性蛋白质的检测, 也可用类似的技术选择迁移介质, 增加中性和碱性蛋白质的分离度, (c) 由于在样品中盐的存在会增加聚焦和移动时间, 增加沉淀的危险, 可以把非离子型洗涤剂或乙二醇加到样品和两性化合物的混合物中, 以减少沉淀, 改善重复性。

4.4 毛细管凝胶电泳 (CGE) 经典的凝胶电泳是用聚丙烯酰胺作支持物进行的区带电泳, 兼有电泳和凝胶过滤的特点, 因此也称为分子筛电泳。毛细管凝胶柱有许多优点, 包括抗对流, 没有渗流, 可以作大小选择, 高效高分离能力, 重复性和稳定性均好等。

毛细管凝胶电泳最重要的用途是 DNA 的图表示和序列测定, 具体方法视填充介质不同分为两种, 一种是填充聚丙烯酰胺那一类的凝胶, 如 Karger 实验室所做的那样, 目前主要要

克服的是寿命问题^[2,14]。另一种是所谓的无胶筛分(non-gel sieving)。此法通常配置以涂渍的毛细管柱,因此降低了电渗流,而通过把一些线性聚合物如:甲基纤维素、羟基丙基甲基纤维素加到缓冲液中使核酸片段以正比于它的分子量的速率迁移,在分离低分子量核酸,比如限制片段和聚合酶链反应产物(PCR)等方面已取得了明显成功,可以在30min内完成碱基对范围从40—1700的DNA片段的分离。在进行这种分离过程中为了得到尖锐的峰型,通常要对样品脱盐,使其中盐的含量低于10mmol/L,虽然通过用水稀释降低盐的浓度,但它同时也降低了样品的浓度,而要使样品的采集高效地进行,则必须增大样品和盐的比例,因此已采用一些专门的脱盐方法。DNA可用乙醇沉淀的办法脱盐,而对于PCR产物的脱盐则可遵循下列程序,加1/10体积的3mol/L醋酸钠(pH5.2)和2体积95%的冷乙醇,让其在干冰-丙酮浴中放置1h,在离心管中离心15min,抽出上层清液,再加入250ml 70:30的乙醇水,离心4min,再抽出上层清液,然后把DNA置于1体积的水里或0.01mol/L的TBE缓冲液中。目前我们已开始进行病毒中DNA片段的图表示研究。快速序列测定将是下一阶段有关各方应用开发的重点,H. Drossman等已经提出了一种用CE对DNA序列反应产物作快速分离的方法,他们在柱内充填聚丙烯酰胺和5%的交联剂,采用激光荧光检测器,整个分析时间要比传统的方法缩短1个数量级以上,作者因此认为有可能做出第二代DNA序列测定仪。

5 一些重要参数

我们采用不同的原料和方法研制了直径为50 μ 的几种不同类型的毛细管柱,以区域电泳、电动力学色谱等操作模式对肽、蛋白质(包括酶和抗体),各种中性和可解药物进行分离,并从各个角度对这些组分的电泳行为及仪器的主要参数进行考察^[7,15]。

自制柱的柱效,在11kV以下对肽而言一般在200000/m左右,个别最高的达700000/m,

对酶稍低,为150000/m左右,这一数据基本上和商品柱相当,寿命已超过200次。

迁移时间和峰面积的重复性通常是另外两个重要的指标,前者大体受到柱涂渍、温度等各种因素影响,也和所采用的样品是单一组分还是复杂混合物有关,我们对分子量为480000的尿酶作2 \times 5次测定所得的相对标准偏差(RSD)均小于1%,而对不同浓度的抗乙肝抗体实际样品7次测定的RSD值为1.84%,基本上已达到了在技术比较成熟期间从色谱仪上可达到的水平,峰面积的重复性要较前者差一些,长期以来,它一直是各仪器制造厂家和研究人员积极努力的重点之一,目前文献报道和一些公司的说明书中已称RSD值能小于2%,我们目前尚未达到这一水平。但随着经验的积累,所得数据已逐步接近这一水平,所有上述讨论都是指绝对值的测定而言的,如果加以内标,其相对标准偏差当然还会大大降低。

检测器的灵敏度是一个值得关注的问题,当然,它和检测器自身的性能有关,就目前商品仪器中采用最多的紫外检测器来说,最多可达 10^{-14} — 10^{-15} mol,已见到最高的文献报道值是 10^{-19} mol,它是在采用电流检测器时达到的。

缓冲液的pH值是影响选择性的的重要因素,这一方面是由于溶质在毛细管内的移动在很大程度上取决于它们所带的电荷,另一方面则是因为pH值的变化还会造成电渗流值的很大改变。一般认为,pH值变化0.01将会使迁移时间变化0.1%,我们已经有很多数据说明pH值对峰对相对位置的影响。

除了缓冲液的pH值外,很多作者已开始重视添加剂的研究,有迹象表明,为为数众多的添加剂中有可能筛选出一大批能显著改善毛细管电泳选择性和功能的对象。

电压是毛细管电泳操作中最重要参数之一,它和柱效的关系已为不少作者所讨论,在一定范围内,电压升高将会使柱效增大,但是它还同时取决于由此产生的焦耳热,如果这种热过大而不能迅速发散,径向的温度梯度和粘度梯

(下转第285页)

持,在此表示感谢。

参 考 文 献

- 1 马秀贞,印明善,李小平. 微生物学杂志,1989;9(1): 10
- 2 李小平,马秀贞,温广梅等. 见: 全国化学学会等编,全国络合催化会议论文摘要集,兰州: 中国科学院兰州化学物理研究所,1987: 92

- 3 印明善,马秀贞,叶乃芝等. 生物工程学报,1986;2(1):52
- 4 Chem W P, Anderson A W. Appl Environ Microbiol, 1979; 38(6): 1111
- 5 Danno G. Agric Biol Chem, 1970; 34(12): 1795
- 6 Suekane M, Tamura M. Agric Biol Chem, 1978; 42(5): 909

CHARACTERIZATION OF THE PURIFIED GLUCOSE ISOMERASES OF *STREPTOMYCES AHYGROSCOPICUS*

Li Xiaoping Huang Youmei

(Lanzhou Institute of Chemical Physics, Academia Sinica, Lanzhou 730000)

Zhang Feng Su Pu

(Biochemistry Lab of Institute of Traditional Chinese Veterinary Medicine, Chinese Academy of Agricultural Sciences)

ABSTRACT

Some enzymatic properties of the purified glucose isomerase of *Streptomyces ahgrosopicus* were examined by means of different methods, such as ultraviolet spectrum (UV), infrared spectrum (IR), amino acid composition analysis and polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), 0.2mm thin-layer electrophoresis (TLE).

The *Streptomyces ahgrosopicus* glucose isomerase was found to consist of one subunit by SDS-PAGE. The molecular weight of the enzyme determined by polyacrylamide gel electrophoresis in a continuous molecular sieve gradient method was 49700. The pI of the enzyme determined by 0.2mm thin-layer electrophoresis method was 5.2. Large differences were found in the amino acid composition compared with the enzymes from other sources.

Key Words *Streptomyces ahgrosopicus* subsp. *thermophilus*, glucose isomerase, enzymatic properties, glucose

(上接第 272 页)

度将会对柱效的增长产生负的影响。

参 考 文 献

- 1 Wallingford R A, Ewing A G. *Advanced in Chromatogr* 1989; 29: 1—75.
- 2 Terabe S. *Anal Chem*, 1990; 62(10): 604
- 3 Giddings J C. *Sep Sci*, 1969; 4: 181
- 4 Knox J H, McCormack K A. *J Liquid Chromatography*, 1989; 12(13): 2435
- 5 Knox J H. *Chromatographia*, 1988; 26: 329
- 6 Grushka E, McCormock R M *et al. Anal Chem*, 1989; 61: 241

- 7 Bingcheng Lin, Xinhua Chu, Yungching Zhang, Do Xin. *Abstracts of 4th International Symposium on Capillary Electrophoresis*, Feb. 6—9, 1992
- 8 Hjerten S. *US Patent*, 4, 680, 201
- 9 Hjerten S. *US Patent*, 4, 725, 343
- 10 Terabe S, Otsuka K *et al. Anal Chem*, 1984; 56: 111
- 11 Terabe S *et al. J Chromatog*, 1989; 480: 403
- 12 Lux J A *et al. J High Resolut Chromatogr*, 1990; 13(2): 145
- 13 Zhu Minda, Roberto R *et al. Bio-Rad reports*
- 14 Cohen A S, Paulus A *et al. Chromatographia* 1987; 24: 15
- 15 林炳承,褚新华,张云清等. 分析化学, 1992; 印刷中