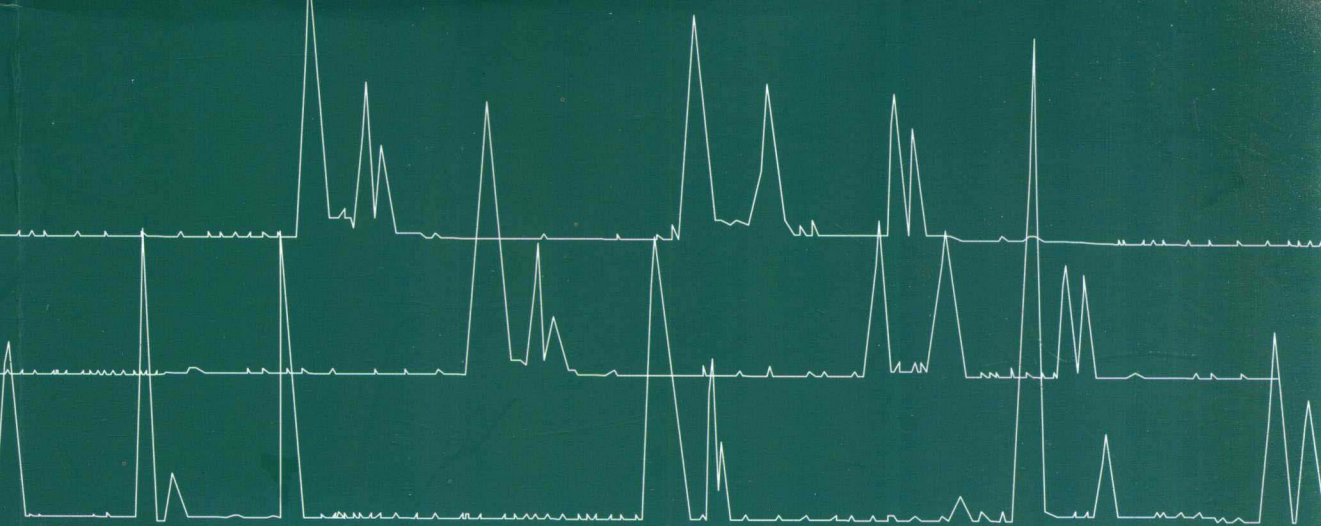




Principle and Method for Analyzing
Proteins and Protein-Small Molecule Interactions
by Capillary Electrophoresis

毛细管电泳分析

蛋白质及蛋白质-小分子相互作用的
原理与方法

主 编 郭 明 胡智燕

副主编 李铭慧 文先红 杜长霞 范文翔 黄凤琴 刘 敏



ZHEJIANG UNIVERSITY PRESS

浙江大学出版社

毛细管电泳分析蛋白质及 蛋白质-小分子相互作用的原理与方法

主 编 郭 明 胡智燕
副主编 李铭慧 文先红
范文翔 黄凤琴



ZHEJIANG UNIVERSITY PRESS
浙江大学出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

毛细管电泳分析蛋白质及蛋白质-小分子相互作用的原理与方法 / 郭明, 胡智燕主编. —杭州: 浙江大学出版社, 2014. 12

ISBN 978-7-308-14091-1

I. ①毛… II. ①郭… ②胡… III. ①毛细管—电泳—分析(化学)—应用—蛋白质—生物合成 IV. ①O657.8 ②Q591.2

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2014) 第 284110 号

毛细管电泳分析蛋白质及蛋白质-小分子相互作用的原理与方法

主 编 郭 明 胡智燕

副主编 李铭慧 文先红 杜长霞 范文翔 黄凤琴 刘 敏

责任编辑 陈静毅

封面设计 续设计

出版发行 浙江大学出版社

(杭州市天目山路 148 号 邮政编码 310007)

(网址: <http://www.zjupress.com>)

排 版 杭州中大图文设计有限公司

印 刷 浙江省良渚印刷厂

开 本 787mm×1092mm 1/16

印 张 11

字 数 234 千

版 次 2014 年 12 月第 1 版 2014 年 12 月第 1 次印刷

书 号 ISBN 978-7-308-14091-1

定 价 28.00 元

版权所有 翻印必究 印装差错 负责调换

浙江大学出版社发行部联系方式: 0571-88925591; <http://zjdxcs.tmall.com>

前 言

毛细管电泳是继高效液相色谱技术之后,在传统电泳基础上发展起来的一种新型高效分离技术,近年来发展迅速,应用领域广泛,涉及生物化学、分子生物学、药物化学、分析化学、食品化学、环境化学和医学等诸多领域。毛细管电泳可以跟很多检测技术联用,使分离和检测同步完成,促进了分离-检测一体化技术的发展。

21 世纪是生命科学大发展的时代,研究蛋白质相互作用原理成为必要的工作之一。毛细管电泳在生物大分子蛋白和肽的应用主要有两大方面:一是其结构的表征;二是研究相互作用。毛细管电泳已成为最有效的纯度检测手段之一,能较好地显示微多样性。用 CE-MS 联用进行分析,可推断蛋白的分子结构。用毛细管电泳进行蛋白自身反应及和小分子相互作用研究是热点,如蛋白结合反应、酶动力学、抗体-抗原结合动力学、受体-配体反应动力学等。

本书较系统地介绍了毛细管电泳发展历史、基本原理和仪器系统,重点介绍蛋白质与小分子相互作用理论基础和方法,详细介绍了蛋白质分析的问题与解决方法,随后介绍毛细管电泳联用技术及应用进展,最后介绍毛细管电泳仪操作流程,对常见问题提出有效的解决方案。

为了使读者便于理解毛细管电泳的基本理论,在编选内容时本书增加了色谱理论。编写中以“精”、“新”为指导思想,在科学性、先进性、可读性上下功夫,力求反映毛细管电泳分析蛋白质的新成就,力求概念准确、深入浅出、突出重点、语言简练、图文并茂。同时加强理论和实践相结合,注重培养基本操作技巧、动手能力和思维能力。本书由郭明、胡智燕主编,李铭慧、文先红、杜长霞、范文翔、黄凤琴和刘敏也参与了编写。特别感谢陈静毅认真细致和不辞劳苦的编辑工作。

由于作者水平有限,书中错误在所难免,恳请读者批评指正。

编 者

2014 年 10 月

目 录

第 1 章 绪论	1
1.1 毛细管电泳的发展概况	1
1.2 毛细管电泳的技术特点与分离模式	3
1.3 毛细管电泳的重要应用与趋势	9
第 2 章 毛细管电泳的基本原理	14
2.1 色谱法中的塔板理论和速率理论	14
2.2 双电层理论	19
2.3 毛细管电泳的基本理论	21
2.4 毛细管电泳的影响因素	26
第 3 章 毛细管电泳仪器系统	32
3.1 毛细管电泳仪基本结构	32
3.2 高压电源	33
3.3 毛细管柱	34
3.4 进样技术	36
3.5 检测器	38
第 4 章 蛋白质与小分子相互作用基本原理	42
4.1 毛细管电泳用于研究分子间相互作用的情况	42
4.2 亲和毛细管电泳与相互作用分析	44
4.3 蛋白质与小分子相互作用基本模型	45
4.4 毛细管电泳的测定方法	50

第 5 章 毛细管电泳蛋白质分析..... 62

5.1 基本概念 62

5.2 蛋白质的吸附与控制 65

5.3 蛋白质的尺寸分离 68

5.4 蛋白质等电聚焦 73

5.5 微量制备 74

5.6 应用与展望 75

第 6 章 联用技术及应用进展..... 82

6.1 毛细管电泳与质谱联用 82

6.2 毛细管电泳与核磁共振联用 87

6.3 微全分析系统 94

第 7 章 毛细管电泳仪操作流程及技巧 100

7.1 操作流程..... 100

7.2 操作注意事项..... 158

7.3 常见问题和解决方法..... 162

参考文献 166

第1章

绪 论

毛细管电泳(capillary electrophoresis, CE)又叫高效毛细管电泳(high performance capillary electrophoresis, HPCE),是继现代高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)技术之后,在传统电泳基础上发展起来的一种新型高效分离技术。毛细管电泳以其无法比拟的高效性和快速性而受到越来越多科学家的青睐,近年来发展最为迅速,应用于生物化学、分子生物学、药物化学、分析化学、食品化学、环境化学和医学等诸多领域。毛细管电泳可以跟很多检测技术联用,使分离和检测同步完成,促进了分离-检测一体化技术的发展。

1.1 毛细管电泳的发展概况

溶液中荷电粒子在电场中的泳动现象,早在19世纪初就已被发现,与色谱工作一开始就作为分析方法来研究不同,电泳在 Michaelis 关于酶的鉴别工作之前,只是作为一种物理化学现象来研究。在19世纪中叶,针对溶液中荷电离子的电场作用下的泳动现象, Wiedemann 和 Buff 开始进行研究,后来在实验的基础上, Kohlrausch 导出了离子移动的理论公式,描述了包括区带电泳、等速电泳和移动界面电泳在内的电泳基本理论。电泳在真正意义上进入分析化学是在 Sverdberg 和 Tiselius 的开拓性研究之后,他们在1926年提出了移动界面电泳技术。在 Tiselius 公布了移动界面电泳技术的细节之后,电泳技术才开始得到较为迅速的发展,并成为生物医学的基础研究手段之一,成功地应用于人血清的分离,获得了血清白蛋白等。

1967年 Hjerte 首先用内径为3 mm的石英毛细管进行了电泳分离。1979年 Mikkers 等首先从理论上研究了电场聚焦现象及其对分离区带扩展的影响,随后在实验上用200 μm 内径的聚四氟乙烯管实现了高效电泳分离,这项研究成为毛细管区带电泳(capillary zone electrophoresis, CZE)发展史上的第一个重大突破。1981年 Jorgenson 等使用更细的毛细管及内径为75 μm 的熔融石英管做CZE,在30 kV电压下每米毛细管的效率高达 4×10^5 的理论塔板数。他们不仅设计出了结构简单的CE装置,还从理论上推导出了CZE分离的效率公式。他们十分成功的实验和异常出色的理论工作,轰动



了分离科学界,激起了巨大的反响,成为高效毛细管电泳划时代的里程碑。CE 高效、快速的特点以及与色谱的相似性,吸引了许多有经验的色谱工作者加入研究 CE 的行列中,促进了毛细管电泳的进一步发展。

1983 年 Hjerten 首次在毛细管中填充聚丙烯酰胺凝胶,从而形成了毛细管凝胶电泳技术(capillary gel electrophoresis, CGE)。CGE 具有极高的分辨本领,可用于蛋白质碎片的分离及 DNA 序列的快速分析。1984 年,Terabe 等在 CE 电解质溶液中加入离子表面活性剂十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfonate, SDS),在溶液中形成离子胶束作假固定相,实现了中性离子的分离,这种模式称为胶束电动毛细管色谱技术。此后,随着毛细管电泳研究的深入,其他分离模式如毛细管等电聚焦(capillary isoelectric focusing, CIEF),毛细管等速电泳,毛细管电色谱(capillary electrochromatography, CEC)等分离模式不断引入,极大地拓宽了毛细管电泳技术的应用范围。

CE 涉及许多基本的理论问题,如区带展宽、塔板高度、热效应、电渗流、分离度的优化等。针对这些理论问题,国内外许多学者进行了大量的研究。如 Rhodes 和 Giddings 等对影响区带展宽因素进行了定量分析;Andreev 等提出了一个数学模型,讨论了电渗流对 CE 效率的影响;林炳承等也对 CE 中各种影响区带展宽的因素进行了定量的分析,得到计算 CE 区带展宽的数学表达式,用计算机对多肽的 CE 分析进行了全过程模拟;陈义等比较系统地研究了毛细管电泳中存在的理论问题,讨论了电泳过程中物质传输的各种动力和描述方程、区带的迁移过程及其变化,以及各种影响分离效率的因素,并对毛细管电泳检测器及进样中的理论问题进行了研究。以上理论的提出,对毛细管电泳的实际应用具有重要的指导意义。

CE 以其高效、快速、柱平衡快、低成本、操作模式多样且易于切换等优点成为近年来分离科学的研究核心。毛细管电泳分离领域逐渐开拓,分离模式不断创新。理论研究和方法的探索以及应用领域的共同需求推动了毛细管电泳仪器的商品化发展。1988—1989 年第一批毛细管电泳商品仪器出现,这使毛细管的应用突飞猛进;1989 年第一届国际毛细管电泳会议的召开标志着一门新的分支学科的产生;1983 年杜邦公司的 Pace 开发出了芯片毛细管电泳;1990 年瑞士的 Ciba-Geigy 公司的 Manz 和 Widmer 首次提出全微分析系统(miniaturized total chemical analysis system, μ -TAS)的概念和设计,并与加拿大的 Alberta 大学合作利用玻璃芯片毛细管电泳完成了对寡核苷酸的分离。在以生物工程为代表的生命科学领域中对多肽、蛋白质(包括酶、抗体)、核苷酸及脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid, DNA)的分离分析需求的基础上,CE 技术以其强劲的优势得到了迅速发展。

从 20 世纪 80 年代后期开始,CE 研究成为分析化学领域的热点,每年举办多次国际性或区域性学术会议。目前,毛细管电泳已成为发展最为迅速、最具发展潜力的微纳分离技术之一。国际毛细管电泳界已将国际毛细管电泳学术报告会(international symposium on high performance capillary electrophoresis, HPCE)改名为国际微尺度生物分离分析大会(international symposium on microscale bioseparations, MSB)。我国的

CE 研究起步早,发展快,研究工作较全面,有些研究成果达到国际先进水平,定期召开全国及亚太地区国际 CE 会议,在国际上有一定的影响。为与国际学术界接轨,根据我国毛细管电泳界同仁的建议,2008 年起全国毛细管电泳会(national symposium on capillary electrophoresis, CCE)改名为全国微纳生物化学分离分析会议(national symposium on micro/nanoscale bioseparations and bioanalysis, CMSB)。

1.2 毛细管电泳的技术特点与分离模式

毛细管电泳技术有显著的优点,同时也有不足。这样的技术特点与其分离模式是分不开的。

1.2.1 毛细管电泳的技术特点

毛细管电泳(CE)通常使用内径为 $25\sim 100\ \mu\text{m}$ 的弹性(聚酰亚胺)涂层熔融石英管。标准毛细管的外径为 $375\ \mu\text{m}$,有些管的外径为 $160\ \mu\text{m}$ 。毛细管的特点是:容积小(一根 $100\ \text{cm}\times 75\ \mu\text{m}$ 管子的容积仅 $4.4\ \mu\text{L}$);侧面/截面积比大,因而散热快、可承受高电场($100\sim 1000\ \text{V/cm}$);可使用自由溶液、凝胶等为支持介质;在溶液介质下能产生平面形状的电渗流。

1. CE 的优点

CE 具备如下优点。

- (1) 高效。塔板数目在 $10^5\sim 10^6/\text{m}$,当采用 CGE 时,塔板数目可达 $10^7/\text{m}$ 以上。
- (2) 快速。一般在十几分钟内完成分离。
- (3) 微量。进样所需的样品体积为纳升($10^{-9}\ \text{L}$)级。
- (4) 多模式。可根据需要选用不同的分离模式且仅需一台仪器。
- (5) 经济。实验消耗不过几毫升缓冲溶液,维持费用很低。
- (6) 自动。CE 是目前自动化程度较高的分离方法。

2. CE 的特点

CE 技术作为一种强有力的分离分析手段,具有以下特点。

(1) 应用范围广。CE 既能分析有机和无机小分子,又能分析多肽和蛋白质等生物大分子;既能用于带电离子的分离,又能用于中性分子的测定;非常适用于复杂混合物的分离分析和药物对映异构体的纯度测定。

(2) 分离效率高。CE 采用 $25\sim 100\ \mu\text{m}$ 内径的熔融石英毛细管柱,限制了电流的产生和管内发热,并采用柱上检测,大大消除了柱外效应。在 $100\sim 500\ \text{V/m}$ 的电场强度下,可以达到每米几十万到上百万理论塔板数的分离柱效。

(3) 分离模式多。目前已经有多种模式,而且仅需一台仪器就可根据需要选用不同

的分离模式,实现各模式之间的切换。

(4) 最小检测限低。虽然采用 25~100 μm 内径的毛细管,光学检测器的光程有限,用一般光吸收检测器时,以浓度表示的灵敏度尚不及 HPLC 高,但以样品绝对量表示的最小检测限却很低。分离分析领域的最低检测限是 CE 采用激光诱导荧光(laser induced fluorescence, LIF)检测器获得的,这也为单分子的检测提供了可能。

(5) 分析成本低。一是毛细管本身成本低,且易于清洗;二是溶剂和试剂消耗量少,废液处理成本低;三是样品用量少,仅为纳升级,这对那些珍贵的样品尤其有利。

(6) 仪器简单。只需要一个高压电源、一个检测器和一截毛细管就可组成一台简单的 CE 仪器,由于操作参数少,方法开发也较为简单。

(7) 环境友好。因为分离介质多为水相,且产生的废液量很少,故对环境的影响很小,符合绿色化学的要求。

3. CE 的不足

虽然 CE 技术优势突出,但存在以下不足。

(1) 由于进样量少,因而制备能力差。

(2) 由于毛细管直径小,使光路太短,用一些检测方法(如紫外吸收光谱法)时,灵敏度较低,非高灵敏度的检测器难以测出样品峰。

(3) 凝胶、色谱填充管需专门的灌制设备。

(4) 电渗会因样品组成而变化,大的侧面与截面积之比能“放大”吸附作用,导致蛋白质等的分离效率下降或不出峰,同时也会影响分离的重现性。

1.2.2 毛细管电泳的分离模式

利用试样中各种离子在电场中电泳淌度的差异是电泳分离带电荷离子的最基本模式,根据试样性质不同,可选择不同的分离类型。每种分离类型的机理和选择性不尽相同。HPCE 的分离模式有毛细管区带电泳、胶束电动毛细管色谱(micellar electrokinetic capillary chromatography, MECC)、毛细管凝胶电泳、毛细管等电聚焦电泳(capillary isoelectric focusing, CIEF)、毛细管等速电泳(capillary isotachopheresis, CITP)、毛细管电色谱(capillary electrochromatography, CEC)、亲和毛细管电泳(affinity capillary electrophoresis, ACE)。此外,随着毛细管电泳技术的不断发展,还逐渐出现了一些新型分离模式,如非水毛细管电泳(nonaqueous capillary electrophoresis, NACE)、毛细管阵列电泳(capillary array electrophoresis, CAE)、芯片毛细管电泳(chip capillary electrophoresis, CCE)等,见表 1-1。

表 1-1 毛细管电泳分离模式及其分类

编号	类型	名称	缓冲液
I	电泳型	毛细管区带电泳(CZE)	管内只填 pH 缓冲溶液
		毛细管凝胶电泳(CGE)	管内填聚丙烯胺等凝胶
		毛细管等电聚焦电泳(CIEF)	管内填充 pH 梯度介质
		毛细管等速电泳(CITP)	通常采用不连续(自由溶液)电泳介质
II	色谱型	填充毛细管电色谱(PCEC)	管内填充各种色谱填料
		空心毛细管电色谱(OTCEC)	毛细管内壁涂有各种所需色谱固定相,管内只填 pH 缓冲溶液
		胶束电动毛细管色谱(MECC)	在 CZE 缓冲液中加入表明活性剂使成胶束
		微乳液电动毛细管电色谱(EECC)	使用水包油缓冲体系
III	联用型	毛细管等速电泳-区带电泳(CITE-CZE)	CITP 用于样品浓缩
		亲和毛细管电泳(ACE)	增加分离选择性
		毛细管电泳-质谱(CE-MS)	MS 用于定性
		毛细管电泳-核磁共振(CE-NMR)	NMR 用于定性
		预柱毛细管电泳(PCCE)	预柱用于样品浓缩
		毛细管电泳-激光诱导荧光(CE-LIF)	具单细胞、单分子分析潜力
IV	其他	阵列毛细管电泳(CAE)	利用一根以上的毛细管进行 CE 操作
		芯片毛细管电泳(CCE)	利用刻制在载玻片上的毛细管通道进行电泳

由表 1-1 可以看出,毛细管电泳类型渐多,尽管新方法的发展研究难度大,但近年来却有不小的进展。其中,建立新的分离模式和联用技术最为突出。很多有魅力的分离模式均来自几种技术的联用,这也是毛细管电泳的发展方向之一。根据分离介质和分离原理,下面简单介绍最基本、最经典的 7 种常用 CE 分离模式。

1. 毛细管区带电泳

毛细管区带电泳(CZE)是毛细管电泳中最简单、最基本、应用最广泛的一种分离模式。在毛细管中仅填充缓冲液,基于溶质组分的迁移时间或淌度的不同而分离。除了溶质组分本身的结构特点和缓冲液组成,不存在其他因素如聚合物网络、pH 梯度或另一分配相对分离的影响。CZE 分离无需固体支持介质,不存在基质效应,能分离淌度差别很小的组分。CZE 中由于电渗流的存在,阴、阳离子可以同时分析,中性溶质电泳迁移为零与电渗流同时流出。有时需要在缓冲液中加入一定的添加剂,用以提高分离选择性,改变电渗流的大小和方向或抑制毛细管壁的吸附等。

CZE 的特点是操作简单、快速、分离效率高,应用范围广。从原理上讲可以适用于所有具有不同淌度的荷电粒子的分离,分子量范围从十几到几十万。

2. 胶束电动毛细管色谱

胶束电动毛细管色谱(MECC)是电泳技术和色谱技术巧妙结合的分离新技术。MECC是在缓冲液中加入离子型表面活性剂如十二烷基硫酸钠,形成胶束,被分离物质在水相和胶束相(准固定相)之间发生分配并随电渗流在毛细管内迁移,达到分离。MECC是毛细管电泳中唯一能同时分离中性物质和离子型物质的分离模式。它是1984年由 Terabe 首先报道的一种新型的毛细管电泳技术,也是目前研究较多,应用较广的一种毛细管电泳操作模式。

MECC是基于胶束增溶和电迁移过程进行的,因此其分离要求有两相:一相是带电的离子胶束,是不固定在毛细管中的假固定相,它具有与周围缓冲液介质不同的电泳淌度,也可称为胶束电泳淌度,并且与分离溶质相互作用(胶束增溶过程);另一相是导电的水溶液相,在电场作用下,水相由电渗流驱动流向阴极(电迁移过程)。对于常用的十二烷基硫酸钠(SDS)胶束,因其表面带负电荷,泳动方向与电渗流相反,朝阳极方向泳动。在缓冲液 $\text{pH} > 5$ 时,电渗流速度大于胶束电泳速度,所以胶束的实际移动方向和电渗流相同,都向阴极移动。中性溶质基于色谱分配原理,在以电渗流驱动的水溶液相和胶束相之间进行分配,疏水性较强的溶质与胶束的作用较强,结合到胶束中的溶质较多也较稳定,相对于疏水性较弱的溶质迁移较慢,未结合的溶质则随电渗流流出。因此,中性溶质按其疏水性不同在两相间的分配系数不同而得到分离。

MECC实际是一种区带电泳技术,只是用离子胶束溶液代替CZE中简单的缓冲溶液,从而引起电泳行为和分离机理上的差别。目前MECC已成功用于生物医药分析、环境监测及化工产品与食品检验等领域。特别是MECC采用手性分配相,可用于手性化合物的分离,这一方法比气相色谱和高效液相色谱采用手性固定相更为方便、实用,具有很好的应用前景。

3. 毛细管凝胶电泳

毛细管凝胶电泳(CGE)是在毛细管中装入单体,引发聚合形成凝胶,主要用于测定蛋白质、DNA等大分子化合物。另有将聚合物溶液等具有筛分作用的物质,如葡聚糖、聚环氧乙烷,装入毛细管中进行分析,称毛细管无胶筛分电泳,故有时将此种模式总称为毛细管筛分电泳,下分为凝胶和无胶筛分两类。它是20世纪80年代后期发展起来的,将凝胶电泳对生物大分子的高效分离能力和毛细管电泳的快速、微量和定量分析相结合,成为当今分离度极高的一种电泳分离技术。

在CZE中,荷电粒子的分离主要是基于它的荷质比不同,而在CGE中,溶质的分离依赖于溶质的净电荷性质和分子大小两个因素。凝胶的网络结构对溶质具有分子筛作用,当带电溶质通过聚合物网络时,产生了阻碍,溶质分子越大,阻碍越大。尤其是对那些荷质比不随分子大小而变的大分子如DNA或SDS-蛋白质复合物,没有凝胶的筛分作用就不能分离。由于凝胶黏性很大、抗对流、能有效减少溶质扩散,从而能获得非常优异的分​​离效果。CGE在实际应用中也有一些不足之处,凝胶较难均匀地填充到毛细管中,

检测中有时电渗流(electroosmotic flow, EOF)足够强大能把凝胶从毛细管内带出。另外一个问题是在填充凝胶的过程中容易产生气泡从而导致不稳定。

CGE 在分子生物学和蛋白质化学上有着十分广泛的应用。在分子生物学上实现了包括寡聚核苷酸纯化、反应基因疗法、DNA 测序和聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)产物分析,在蛋白质化学方面用于多肽和蛋白质分子的分子量测定、原蛋白和 SDS 结合蛋白的分离等。另外,CGE 还可用于其他带电物质的分离,并可通过加入添加剂如手性添加剂、离子对试剂、络合试剂等改变分离的选择性。

4. 毛细管等电聚焦电泳

毛细管等电聚焦(CIEF)是通过内壁涂层使电渗流减到最小,再将样品和两性电解质混合进样,两个电极槽中分别为酸和碱,加高电压后,在毛细管内建立了 pH 梯度,溶质在毛细管中迁移至各自的等电点(pI),形成明显区带,聚焦后用压力或改变检测器末端电极槽储液的 pH 值使溶质通过检测器。

由于毛细管本身的抗对流性质,CIEF 可在自由溶液中进行,也可在凝胶中进行。CIEF 不但具有传统等电聚焦的优点,而且具有毛细管电泳的高效、快速、微量等特点,使 CIEF 在蛋白质、多肽的分离分析上有很好的应用前景。

CIEF 是根据蛋白质的 pI 值不同而进行分离的。采用两性电解质混合物作为载体电解质,当在用溶质和两性电解质混合溶液充满的毛细管两端加电场时,pI 值大于两性电解质混合物 pH 值的溶质和两性电解质带正电,向负极移动;pI 值小于两性电解质混合物 pH 值的溶质和两性电解质带负电,向正极移动,当它们迁移至 $\text{pH}=\text{pI}$ 的区带时,净电荷为零,不再迁移。因此不同等电点的两性电解质在电场中从阳极到阴极按 pI 值逐渐增加连续排列,从而形成稳定的 pH 梯度,梯度中每一处的 pH 值,将取决于该处两性电解质的 pI 值。蛋白质由于其等电点的不同而得到分离。这个过程称为等电聚焦。等电聚焦过程的状态可以用电流来指示,一旦聚焦完成达到稳态,电荷不再移动,即电流为零。在聚焦完成后,溶质和两性电解质被移动,区带通过检测窗。这种移动可以通过从毛细管一端施加压力或在一个电极槽中加入盐类来实现。

CIEF 可用于测定物质的等电点,分离异构体和测定其他方法难以分离的一些物质。

5. 毛细管等速电泳

毛细管等速电泳(CITP)是一种“移动界面”电泳技术。在 CITP 中,使用两个缓冲液系统,建立一个所有区带以相同速度移动的状态。这两种缓冲液分别称为前导电解质和尾随电解质,样品加在前导和尾随电解质交界处。一次 CITP 实验只能分离正离子或负离子,不能同时分析。

在 CITP 中,各种离子(正或负离子)以独立的区带移动,但移动速度相等,等于前导离子的移动速度。如果任何两个相邻区带中正或负离子移动速度不一样,则必然导致区带之间脱开,使脱开区缺少正离子或负离子,这是电中性原理不容许的。在分离过程

中场强会自行调整以维持区带的等速移动,淌度大的离子所在的区带场强较低,这种现象使各个区带间保持着明显的界面。如果一个离子扩散到另一个相邻的区带,它的迁移速率发生变化,使其很快又回到原来所在的区带。

CITP 的另一个特征是在每一个区带内,溶质的浓度保持恒定,这取决于前导离子的浓度。因为 CITP 通常是恒流操作,在每一个区带内离子浓度与其淌度之比需保持恒定。溶质浓度低于或高于前导电解质的区带被压缩或扩展以调整到一个合适的浓度,CITP 的这一溶质浓缩原理常常被用来进行 CZE、MECC 或 CGE 的柱前预浓缩。

6. 毛细管电色谱

毛细管电色谱(CEC)以内含色谱固定相的毛细管为分离柱,兼具毛细管电泳及高效液相色谱的双重分离机理,既可分离带电物质也可分离中性物质。毛细管电色谱法是用电渗流或电渗流结合压力流来推动流动相的一种液相色谱法。

因此,毛细管电色谱法可以说是 HPLC 和 HPCE 的有机结合,它不仅克服了 HPLC 中压力流本身流速不均匀引起的峰扩展,而且柱内无压降,使峰扩展只与溶质扩散系数有关,从而获得了接近于 HPCE 水平的高柱效,同时还具备了 HPLC 的选择性。CEC 是采用电场推动流动相,其线速度与柱的直径和所填微粒的大小无关,因而在毛细管中几乎没有流速梯度。谱带展宽效应相应就十分小。

CEC 作为一种双重机理的分析方法,在生物分子的分析分离中有着独特的优势,其应用主要集中在氨基酸、多肽、蛋白质以及核酸的分析中。CEC 可选择不同的固定相来提高选择性和扩大分离应用范围。在分离中性粒子时,不需像 MECC 那样使用表面活性剂,有利于和 MS 联用。可选用离子交换树脂对带电组分进行分离,还可以通过在固定相上键合手性选择剂或可用非手性固定相在缓冲液中加入手性选择剂进行手性化合物的拆分。CEC 作为一种发展中的分离技术,将是 CE 中最有前途的方法之一。CEC 很多是以药物为模型化合物来研究评价色谱柱的性能;同时也用于生物体液,如尿液等临床药品分析检测中,这为临床或相关药检机构实现药品的快速高效检测提供了更新更好的选择。

7. 非水毛细管电泳

在水溶液中溶解度很小的被分析物,通常在分离毛细管管壁上的吸附也非常明显,且用来调整分离条件的实验参数有一定的局限性。非水毛细管电泳(NACE)成功解决了强疏水性样品在毛细管电泳中的分离分析问题,扩展了毛细管电泳技术分析对象的范围。在某些非水介质中,可加以较高的电压,而不产生明显的焦耳热,从而提高毛细管电泳分离效率。此外,被分析物在非水溶剂中与在水中有不同的酸碱化学和离子溶剂化效应,某些非水溶剂还有与溶质分子形成离子对的能力及影响溶质在溶剂中产生各种化学平衡的能力,从而影响分离选择性。同时,非水溶剂还可减小疏水化合物与带负电荷的毛细管内壁的相互作用,从而减少吸附。在检测方面,非水毛细管电泳技术也具有独特的优势和发展潜力,它可与质谱检测器、激光诱导荧光检测器等检测器联用,

从而大大提高分析灵敏度。因此,近年来非水毛细管电泳已被广泛用于分离分析各种药物、肽类、有机离子和无机离子等。

1.3 毛细管电泳的重要应用与趋势

1.3.1 毛细管电泳的重要应用

CE的发展使分析科学得以从微升水平进入纳升水平,并使单细胞分析乃至单分子分析成为可能。CE的主要应用领域是生命科学,分离对象涉及氨基酸、多肽、蛋白质、核酸等生物分子,对蛋白质结构分析具有重要意义的肽图,对人体基因工程具有决定性作用的DNA测序等许多当代生命科学中分离分析难题,CE都已涉及。在此简要介绍CE在分子生物学和生物化学等研究领域的重要应用。

1. 蛋白分析

(1) 蛋白样品预浓缩

Cai等将亚氨基二乙酸键和到毛细管内壁上,螯合金属离子后,对金属结合蛋白进行预浓缩,用锌离子对碳酸苷酶预浓缩,可提高检测限25倍。Colc等在150 μm 石英毛细管中填充蛋白G与抗胰岛素抗体形成免疫亲和固定相,用以对胰岛素样品进行预浓缩,可使样品中胰岛素浓度提高1000倍。

(2) 蛋白质构效关系研究

亲和毛细管电泳高分辨率有助于识别蛋白质微不均一性,而对蛋白质不均一性的研究,有助于对蛋白结构与功能的认识。Haupt等以铜离子螯合物为亲和配体,检测出糜蛋白酶组氨酸残基不同而导致蛋白微不均一性。Shimura等应用APCE检测出重组人生长因子中由于脱氨基数目不同而导致三种异构体。

(3) 蛋白-配体相互作用研究及亲和常数测定

研究酶与底物、抑制剂相互作用,是ACE技术应用的一个重要方面,毛细管柱可作为一个微量反应器。Gomez等研究碳酸酐酶B和带电苯磺酰胺的作用表明,采用受体蛋白与中性标记物、非特异性蛋白同时电泳方法,可校正电渗流变化和非特异性相互作用对受体滴度的影响,在电渗流变化明显的情况下同样可得到很好的测定结果。Zhab等设计双酶体系在毛细管内反应,一个底物两个酶分别进样,底物与酶分别反应,得到不同产物,通过研究在不同酶浓度比时的产物数目,可获得底物与两酶相互关系的信息。Yoshimoto等将 β -半乳糖苷酶固定于毛细管柱内表面,与底物半乳糖苷在柱内发生酶催化反应,从谱图中产物峰高可推出反应初始速度,进而算出反应动力学常数即米氏常数。此方法测米氏常数,仅耗费微克量酶及纳克量底物,远小于传统亲和色谱测定所需量。

毛细管电泳一个重要部分是研究抗原-抗体相互作用。Chu等研究抗人血清白蛋白



单克隆抗体与人血清白蛋白之间相互作用,计算抗原与抗体结合量。Heegaard 研究抗磷酸酪氨酸单克隆抗体与磷酸酪氨酸抗原-抗体反应,通过不同抗原浓度下抗体迁移率变化,计算解吸常数。抗 gag 蛋白 p24 抗体(p24 antibody against gag protein)是艾滋病病毒(human immunodeficiency virus, HIV)感染者最初产生的抗体之一,当 HIV 感染者发展成为艾滋病患者时,p24 抗体在体内含量显著减小。Nilsson 等利用 ACE 技术研究 p24 蛋白抗原决定簇与其抗体结合作用,分析根据 p24 蛋白抗原决定簇序列合成一系列 N 端、C 端截短肽段与抗体结合作用,找出亲和最强肽段。

用 ACE 还可进行竞争性免疫分析。Schnerr 等建立检测 PrPSC 竞争性免疫分析方法,PrPSC 是一种聚集蛋白,得海绵状脑病羊的特征便是脑内堆积着这种蛋白聚集体,选取 PrPSC 几个肽段,以荧光标记,制备每个肽段抗体,免疫竞争反应后,用毛细管电泳分离与抗体结合的标记肽段和游离标记肽段。由正常羊脑中提取的样品与标记肽段不发生竞争反应,由此可区分正常羊与染病羊。Tao 等研究标记和未标记胰岛素与抗体的结合作用,测定亲和常数,并对仪器进行改造,制造一个柱上微量反应装置,可进行在线自动竞争免疫分析。

对蛋白与肝素结合研究也是 ACE 技术应用的一个方面。Victoria 等制备固定化肝素亲和柱分析酸性成纤维细胞生长因子的肝素结合结构,用此亲和柱可分开天然构型与结构变异肽段,两者的差异仅在于一个脯氨酸残基立体构象不同(天然肽段脯氨酸残基为 L 型;变构肽段脯氨酸残基为 D 型)。Heegaard 等结合 ACE、HPLC 和 MS 技术,研究淀粉样蛋白肝素结合位点序列。蛋白由酶水解为肽片段,肽段经亲和色谱和 ACE 分离,得到与肝素结合肽段,经质谱鉴定为新的肝素结合序列。Heegaard 等还研究乳铁蛋白与肝素作用,对比人奶中和人粒细胞中乳铁蛋白与肝素的结合能力。

ACE 技术还用于蛋白与金属离子结合分析。金属离子属于小配体,对蛋白迁移时间影响不大。为了解决这一问题,Haupt 等将 Cu^{2+} 螯合物共价结合到线性聚合物单甲氧基聚乙烯乙二醇上,制成固定化金属离子亲和配体,得到较好结果。

2. 肽图分析

肽图是蛋白指纹图,是对蛋白进行鉴定和表征的有效、重要手段之一。Rush 等引入亲和机制,利用缓冲液中离子对试剂庚烷磺酸与红细胞生成素作用,改善分辨率,所得肽图可区分糖肽和非糖基化肽,至少能分辨出 12 个糖肽类型。

蛋白质一级结构表征的内容包括纯度、含量、等电点、分子量、肽谱、氨基酸序列和 N 端序列的测定等,CE 已广泛用作最有效的纯度检测手段,它可检测出多肽链上单个氨基酸的差异。用 CIEF 测定等电点,分辨率可达 0.01 pH 单位。尤其是肽谱用 CE-MS 联用进行分析,可推断蛋白的分子结构。蛋白结构的完全表征尚需采用多种 CE 模式,结合多种仪器联用才能得到正确结果。

3. DNA 分析

DNA 分析包括碱基、核苷、核苷酸、寡核苷酸、引物、探针、单链 DNA、双链 DNA

(DNA 片段、PCR 产物)分析及 DNA 序列测定。CZE 和 MECC 通常用来分离碱基、核苷酸等。CGE 则用于较大的寡核苷酸和 DNA 序列分析。已有 CE 测定 DNA 序列的商品仪器面市,但快速测定 DNA 序列的仪器仍在研究中。Akashi 等采用聚 9-乙烯基腺嘌呤与聚丙烯酰胺偶联的凝胶分离含脱氧核苷酸的寡聚脱氧核苷酸,结果表明脱氧核苷酸顺序对其保留时间有很大影响。相关实验研究聚 9-乙烯基腺嘌呤分子量和浓度、毛细管温度、尿素浓度等因素对分离行为的影响,并对分离条件进行优化。

由于人类基因组工程的提出,高速 DNA 测序引起了人们的广泛注意。由于对核苷酸及其聚合物极高的分辨率,毛细管电泳在 DNA 测序中的应用潜力也受到重视。在高电场和使用阵列毛细管条件下,其潜在的测序能力远远超过了现有方法。DNA 分析中 CE 分离、鉴别 PCR 扩增产物及 DNA 基因突变是其重要发展方向。

4. 药物研究

CE 在药物分析上的应用分为两方面。一方面是原药的定量、原药中杂质的测定、药剂分析以及对它们稳定性的评价等以药品质量管理为目的的测定方法。这些方法要求有良好的选择性、适当的分析灵敏度和可靠的准确度等。毛细管电泳法已经日益广泛地应用到中药有效成分的分离和含量测定中,分离测定的成分包括生物碱、黄酮类、有机酸类、酚类、苷类、蒽醌类、香豆素类等。另一方面是对进入人体内的药物或代谢物的吸收、分布、代谢、排泄等体内动态的研究,即临床药物分析。这两部分的测定一般需要分离和检测手段相结合。近年来,用毛细管电泳法进行生物样本中的药物及其代谢产物的分析已成为研究热点。已有文献报道用 CE 法监测腺苷及其代谢物含量变化;用 CE 法测定人血浆中的格列本脲、二甲双胍、苯乙双胍含量;用 CE-化学发光法检测人尿中儿茶酚胺的含量;用 CZE-安培法测定尿中的 L-酪氨酸及其代谢物浓度;用 CZE 法测定人尿中两种巴比妥盐的浓度;用 HPCE 法测定头孢克洛血浆浓度。

周新等采用亲和毛细管电泳技术,对木樨草素、槲皮素和山萘酚三种黄酮类化合物与人血清白蛋白(HSA)结合常数进行研究,利用药物淌度变化和蛋白浓度关系,计算得到木樨草素、槲皮素和山萘酚与 HSA 结合常数。多肽类抗生素万古霉素可与细菌细胞壁肽聚糖前体末端为 D-Ala-D-Ala 五肽特异性结合,阻止细菌细胞壁合成。一些细菌可合成末端结构改变五肽前体,这些五肽与万古霉素结合力减小,从而使细菌具有耐药性。Liu 等利用 ACE 技术比较 3 种细菌五肽前体与万古霉素亲和力大小,并经质谱分析证明,与万古霉素无明显亲和力的两种耐药菌五肽前体末端结构为 D-Ala-D-lactate。由于新药开发策略发展,ACE 技术还表现出在新药筛选方面的应用前景。传统开发方法是将众多化合物逐个合成与筛选。新的开发策略是直接测试合成化合物组合库,即从含上百种化合物混合物中筛选先导药物。Chu 等利用 ACE-MS 技术建立从含上百个成分小肽组合库中筛选万古霉素活性配体方法。ACE 和 MS 技术联用,可使化合物筛选和结构鉴定一步完成。

5. 手性分离

手性对映体分离、鉴定有巨大的应用价值,CE 有多种模式可用于手性分离。常用