

毛细管电泳研究最新亮点

屈 锋

(北京理工大学生命学院,北京 100081)



屈 锋:北京理工大学生命学院教授。1985年毕业于西南大学化学系,1994年获中国科学院生态环境研究中心环境化学硕士学位。1997年获北京大学化学与分子工程学院分析化学博士学位。1998-2000年分别在香港中文大学化学系、美国 Southern Methodist University 生命科学系做博士后工作。2001-2004年在中国科学院生态环境研究中心环境化学与生态毒理学实验室工作,2005年调入北京理工大学生命学院,现任生物工程系副主任。研究方向为生物医学分析检测和生物分离。主要从事毛细管电泳和色谱技术在细胞、微生物、蛋白质和核酸分析检测中的新方法研究。

现任中国色谱学会和北京色谱学会理事,《色谱》等期刊编委。

1 无机多聚磷酸盐的毛细管凝胶电泳分析

多聚磷酸盐是一种由几个至数百个磷酸残基相互聚合形成的线性多聚体,广泛存在于自然界的无机环境和细菌、真菌等低等单细胞生物和高等哺乳动物等生命有机体中。多聚磷酸盐分析是探寻地球生命的化学和生物起源的基本研究内容。传统的多聚磷酸盐分析主要采用凝胶电泳和凝胶染色检测,方法烦琐,耗时长。采用阴离子交换色谱结合电导检测,对磷酸盐聚合度应用范围较窄。多聚磷酸盐的毛细管电泳分析主要采用涂层毛细管和管内填充线性聚丙烯酰胺筛分介质的方法,其在毛细管的重复使用、方法的重现性以及高聚合度多聚磷酸盐的分析中存在不足。Whitesides等用低黏度的聚 N,N -二甲基丙烯酰胺(PDMA)作为毛细管凝胶电泳介质,以对苯二甲酸盐为背景吸收电解质,通过优化背景电解质的pH等手段实现了聚合度可达70的聚磷酸盐的高分辨分离和间接灵敏检测。通过在出口端样品瓶中加入聚乙二醇(PEG)与毛细管内溶液密度平衡,使分离电流稳定,重现性提高。该方法简单、方便,并可拓展用于其他无生色团的生物高分子多聚阴离子混合物(如硫酸多糖、低聚磷酸盐二酯、磷壁酸、透明质酸、磷酸软骨素等)的高分辨分析检测。详见:*Anal Chem*, 2010, 82:6838~6846。

2 压力辅助的毛细管电泳超快速分析红细胞样品中的腺苷酸组分

腺嘌呤核苷三磷酸(ATP)、腺嘌呤核苷二磷酸(ADP)和腺嘌呤核苷单磷酸(AMP)组成了生物体中的腺苷酸系统,它们在生物体中起重要的生物功能作用。ATP是体内组织和细胞的一切生命活动所需能量的直接来源,生命活动的过程中活细胞内部时刻进行着ATP与ADP的相互转化,同时也伴随着能量的储存和释放。3种腺苷酸还参与蛋白质、脂肪、糖和核苷酸的合成,并具有促使机体细胞的修复和再生、增强细胞代谢活性等作用。应用液相色谱分析3种腺苷酸所需的时间为30~45 min。基于3种腺苷酸具有明显不同的负电荷性质,采用毛细管电泳可对其进行快速的分离分析。Zinellu等在前期的短端进样快速分析(Electrophoresis, 2008, 29:3069)的基础上,创建了电泳过程中同时加压辅助电泳分离的超常规压力/电压技术。他们使用了贝克曼公司配有二极管阵列检测器(DAD)的MDQ CE系统。分离在20 mmol/L醋酸钠缓冲液(pH 3.8)、30℃、25 kV(120 mA)、反向电压(正极为出口端)条件下进行,电泳分离的同时由进样端(负极)向出口端(正极)施加1.378 kPa

(0.2 psi)的压力。为避免 ATP 的水解,他们还采用酸沉淀方法提取红细胞中腺苷酸的条件进行了优化。采用此方法,3种腺苷酸可在 1.5 min 内实现高分辨分析,20个红细胞样品的测定可在 60 min 内完成。该方法可用于临床实际样品中 ATP 的准确和高通量的超快速分析。该方法也对开发商用毛细管电泳仪的电泳和压力双功能分离作用提供了新的思路。详见: *Electrophoresis*, 2010, 31: 2854 ~ 2857。

3 包埋纳米金的聚阳离子涂层毛细管电泳和硼掺杂金刚石电极电化学检测的尿液生物标志物的电泳分析

体液中与疾病相关的生物标志物的发现和分析是近年来生物学分析检测中的重要内容之一。尿液中香草扁桃酸(VMA)和高香草酸(HVA,儿茶酚胺代谢物)含量及相对比值的分析有助于对疾病发展阶段、肿瘤发展、儿童的神经母细胞瘤的预测。发展尿液和其他生物样品中生物标志物的快速灵敏的分析方法具有重要的临床意义。Luong 等提出在色氨酸和其他 8 种重要的多巴胺和吲哚胺类物质共存时检测 3-吲哚硫酸盐(IXS,色氨酸代谢物)、HVA 和 VMA 的毛细管电泳分析检测新方法。通过包埋在聚二烯丙基二甲基氯化铵的纳米金(27 nm)对毛细管内壁的涂层修饰,形成稳定的内壁涂层。该涂层使电渗流反向,使 IXS、HVA 和 VMA 快速迁移,而其他内源性化合物抗坏血酸、尿酸、儿茶酚胺和吲哚胺的迁移滞后。该涂层的性质稳定,提高了上述多种分析物分离的分辨率。此外,该毛细管电泳分析中使用热丝化学气相沉积构建的硼掺杂金刚石电极对分析物进行了高灵敏的电化学检测,该电极在反复用于实际尿样分析后也不会被污染。详见: *Anal Chem*, 2010, 82: 6895 ~ 6903。

4 毛细管区带电泳表征接枝和非接枝乳清蛋白的氧化铁核/硅壳纳米粒子

当今的生物学分析检测中越来越多地引入纳米粒子。大家所关注的除量子点外,超顺磁性的氧化铁纳米粒子因在磁共振影像中作为造影剂,在热疗治疗、药物输送、肝细胞分离和纯化、荧光细胞标记以及脱氧核糖核酸(DNA)纯化中得到了广泛的应用。所有这些应用都需要对纳米粒子进行表面修饰。在前期的研究中,毛细管电泳方法主要用于表征生物大分子接枝的量子点纳米粒子。Varenne 等报道了氨基酸/PEG 双功能基团修饰的氧化铁核/硅壳的纳米粒子表面接枝 α -乳清蛋白和非接枝蛋白纳米粒子的毛细管电泳表征和分离方法。利用 DDAB(didodecyldimethylammonium bromide)动态涂层或 HPC(hydroxypropylcellulose)永久涂层修饰的毛细管,研究了使胶体溶液稳定并可与后续免疫分析兼容的优化分离条件,如温度、溶液 pH、离子强度和电场强度等。纳米粒子的分散和聚集状态可由毛细管电泳轮廓图清晰表征;接枝蛋白和非接枝蛋白纳米粒子在 10 mmol/L 2-(*N*-吗啉)乙磺酸(MES)/NaOH(pH 6.0)溶液中,在 18 ~ 60 °C 范围内保持稳定,温度对二者的 Zeta 电位没有明显的影响;在不同 pH(pH 4.5 ~ 8)缓冲液体系中,接枝蛋白和非接枝蛋白纳米粒子的迁移率差别不明显,仅当溶液的 pH = 4(小于乳清蛋白的 pI)时,因接枝蛋白表面带正电荷,接枝蛋白纳米粒子的迁移率显著大于非接枝蛋白纳米粒子。考虑后续为适应抗原-抗体反应和接枝蛋白存储的稳定性,pH 6 是最佳的选择;在电泳分析中,应用两种不同涂层的毛细管进行分离,电场强度对接枝蛋白和非接枝蛋白纳米粒子的影响有所不同:DDAB 涂层的毛细管适合采用低电压分离,而 HPC 涂层的毛细管适合采用高电压分离。离子强度影响纳米粒子的稳定性和聚集状态,影响接枝蛋白和非接枝蛋白纳米粒子的聚集形成,并对两种粒子影响的阈值不同(接枝蛋白 > 30 mmol/L,非接枝蛋白 > 100 mmol/L)。该方法表明,毛细管电泳是表征纳米粒子功能化修饰过程随着时间、溶液条件等变化的简单有效的方法,在肉眼尚不能观察到其变化的时间(1 ~ 2 d)内,可以准确灵敏地检测其修饰和聚集状态,是纳米粒子常规表征方法的一种简便、快速和可行的替代方法。详见: *Electrophoresis*, 2010, 31: 2754 ~ 2761。