科学通报 2008 年 第 53 卷 第 14 期: 1645 ~ 1649
论 文
《中国科学》杂志社
SCIENCE IN CHINA PRESS

部分交联聚丙烯酰胺用于毛细管凝胶电泳蛋白质分离

周瑾, 徐建栋, 谢瑶, 屈锋, 邓玉林, 耿利娜*

北京理工大学生命科学与技术学院, 北京 100081
* 联系人, E-mail: lngeng@eyou.com

2008-01-08 收稿, 2008-05-21 接受
国家自然科学基金(批准号: 20705005)和北京理工大学基础研究基金(批准号: 1060050320708)资助项目

摘要 以高分辨低黏度可替换的部分交联聚丙烯酰胺作为毛细管凝胶电泳的分离筛分介质, 实现了溶菌酶、细胞色素 C、核糖核酸酶 A 和胰蛋白酶 4 种碱性蛋白的基线分离. 该聚合物材料具有的动态涂渍能力减少了毛细管壁对蛋白质的吸附, 显著改善了分离重现性. 混合使用两种部分交联聚合物, 分离分辨率和塔板数获得进一步提高. 初步实验研究结合分离机制的解析, 这种具有多种优异性能的部分交联聚丙烯酰胺聚合物材料, 介于交联聚合物凝胶和非交联线性凝胶之间的一个中间状态, 有望在毛细管电泳以及微流控芯片电泳等生物分离领域发挥重要作用.

关键词
毛细管凝胶电泳
部分交联聚丙烯酰胺
蛋白质分离

聚丙烯酰胺凝胶电泳在过去 30 年已经被广泛应用于蛋白质的分离, 和传统平板凝胶相比, 近些年毛细管凝胶电泳(CGE)以其高分离分辨率、快速、样品用量少、在线检测以及自动连续洗脱等诸多优势得到重视和应用. 目前主要有两种方法在微米尺度内径的毛细管通道内构建筛分介质. 第一种方法建立于毛细管电泳发展初期, 通过柱内原位聚合的方法将聚丙烯酰胺凝胶(PAGE)引入毛细管电泳[1~3]. 但由于凝胶收缩容易产生气泡的问题非常突出, 以及制备困难, 对聚合物产物的性质缺乏了解和预见, 而难以实现对原位聚合过程的严格质量控制, 无法保证分离重现性等诸多问题限制了这类交联介质的应用. 所以, 这种直接将传统平板凝胶电泳技术转移到毛细管电泳的方法并不凑效[4].

另一种构建筛分网络的方法是将柱外预聚合的凝胶高压泵入毛细管内. 这种方法亦存在不足, 在高压电场作用下仍然有气泡产生, 注入和更换这样的高黏度胶非常困难. 使用一类非交联可替换聚合物材料建立的无胶筛分毛细管电泳分离方法, 可以在一定程度上克服上述困难[5], 包括非交联线性聚丙烯酰胺(LPA)[6]、葡聚糖[7]、聚乙二醇[8]、羟丙基纤维素[9,10]以及*N*,*N*-二甲基丙烯酰胺和*N*,*N*-二乙甲基丙烯酰胺的共聚物[11]等在分离蛋白质和DNA中已得到众多应用, 其中线性聚丙烯酰胺以其高分辨分离能力应用最多[4,12]. 这些材料在高电场下更为稳定, 且易于更换, 可是这类介质筛分分辨率低, 虽然依靠增大浓度的方法可提高分离分辨率, 但改善很有限, 同时随之带来黏度增大和断流等问题[12,13]. 目前, 对毛细管电泳凝胶分离介质的研究主要集中在追求高筛分能力、低黏度、动态涂层能力及相应的分离机理解析上. 有报道借助一种低黏度可控交联的聚丙烯酰胺凝胶分离经变性剂十二烷基磺酸钠(SDS)处理的蛋白质, 获得了比线性聚丙烯酰胺更高的分离分辨率, 并且该凝胶具有体系黏度适宜的特点[5].

目前毛细管凝胶电泳(CGE)绝大多数局限于蛋白质分子量的测定, 测定过程中蛋白质需被变性处理, 很少有应用CGE分离分析活性蛋白质的报道[14~16], 然而只有实现活性蛋白质的分离才能更好地为生物相关研究提供服务, 比如在继承传统凝胶电泳优势的基础上, 开发出高通量、高分辨率和快速的微通道电泳分离分析新技术和新方法, 满足蛋白质组学所提出的更高要求. 因此, 在参考文献[5]的基础上, 本文报道使用一种或两种混合的部分交联聚丙烯酰胺凝胶(semi-CPAs)进行非变性蛋白质的CGE

分离，不仅实现了碱性蛋白质的基线分离，同时发现这种材料具有良好的动态涂覆毛细管内壁的能力. 分析认为，这种新型部分交联聚丙烯酰胺凝胶是介于交联凝胶和非交联线性可替换凝胶筛分介质之间的一个状态.

1 实验

1.1 材料

丙烯酰胺，*N*,*N*′-甲叉双丙烯酰胺(Bis)，Tris-Tricine 缓冲溶液，溶菌酶(pI 11.0, MW 14300 kD)，细胞色素 C(9.9, 11700 kD)，核糖核酸酶 A(7.8, 13700 kD)和胰蛋白酶(8.9, 23300 kD) 4 种碱性蛋白，均购于北京拜尔迪生物技术公司. *N*,*N*,*N*′,*N*′-四甲基二乙胺(TEMED)和γ-甲基丙烯酸氧丙基三甲氧基硅烷(MAPS)(Sigma-Aldrich)、二甲基亚砜(Amresco)、过硫酸铵(APS)以及其他化学试剂均从北京化学试剂公司购买. 所有的液体溶液均使用 Milli-Q 纯化系统制备的纯水配制.

1.2 仪器及条件参数

Agient^{3D} 高效毛细管电泳仪(Waldbronn, Germany)，配有二极管阵列检测器，检测波长 280 nm；电泳电压 10 kV；柱温 15℃；使用分别含 0.12 mol/L Tricine 和 0.042 mol/L Tris 的缓冲溶液；内径 100 μm，有效长度 45 cm 的熔融石英毛细管(河北永年光导纤维厂)，并按照文献[17]的方法进行聚丙烯酰胺涂层处理；蛋白质样品的浓度为 1 mg/mL. 所有样品采用 50 psi 压力进样 5 s. 缓冲溶液使用 0.45 μm 的滤膜过滤，并超声脱气.

1.3 Semi-CPAs 的制备

参考文献[5]的方法，将单体丙烯酰胺和交联剂 Bis 溶于缓冲溶液中. 真空脱气后，加入一定量的 APS 和 TEMED 部分引发聚合，室温下交联反应 24 h 后，放入 4℃冰箱中保存.

2 结果与讨论

2.1 应用 semi-CPAs 进行毛细管凝胶电泳蛋白质分离

如图 1(a)所示，当毛细管电泳缓冲溶液中引入 semi-CPA 后，4 种未经 SDS 处理的碱性蛋白溶菌酶、细胞色素 C、核糖核酸酶 A 以及胰蛋白酶得到了基线分离. 其中，蛋白质分子的碱性越强则迁移越快，而胰蛋白酶的分子量几乎是其他蛋白质分子的两倍，迁移速度慢而最后出峰. 如果电泳缓冲溶液中不含 semi-CPA，仅凭荷质比的差异，蛋白质未能得到分离(图 1(b)). 在 SDS-PAGE 中，电泳分离完全取决于被分离物质分子量的不同，不仅蛋白质变性失活，而且体系分离能力有限. 而在本实验体系中，荷质比非常接近的溶菌酶、细胞色素 C、核糖核酸酶 A 仍然实现良好的分离. 因此，基于蛋白质分子表面所带电荷、蛋白质分子的大小以及形状的差异等多种电泳作用机制的参与显著提高了分离分辨率.

凝胶的筛分能力很大程度上受到单体浓度(用 *T* 表示)以及交联剂浓度(用 *C* 表示)的影响. 经过初步对比实验，以 4%*T*-0.4%*C* 浓度交联聚合的 semi-CPA 是分离 4 种碱性蛋白的最佳配比(图 1(a)). 低浓度的单体和交联剂分离情况不佳，而提高单体以及交联剂的浓度并没有带来显著的改善，同时体系黏度增大. 图 1(c)给出使用 4%*T* 和 0.8%*C* 配比的 semi-CPA 的 CGE 谱图，过度刚性的结构并不能更有效分离本实验中 4 种柔性的蛋白质分子.

2.2 混合 semi-CPAs 分离蛋白

由于包括蛋白质在内的各种生物大分子的复杂特性，仅凭借单一分离介质无法解决所有生物分离问题，因此开始不断有混合使用聚合物溶液或者应用共聚物的报道[18~23]. 本实验也配制了含两种具有不同单体或不同交联剂浓度的混合semi-CPAs凝胶，对其分离能力进行了初步考察. 结果表明，5%*T*-0.4%*C* 和 2%*T*-0.4%*C*的凝胶溶液混合使用后，最难实现分离的溶菌酶和细胞色素C的分离度由原来单一凝胶体系下的 4.4 提高到 5.4，并且最慢出峰的胰蛋白酶的柱效也显著改善(图 2). 其原因是由于混合凝胶体系在没有发生黏度增大的同时，形成了更为精细、宽孔径范围并具有一定弹性的凝胶筛分孔穴，因此与蛋白质分子的选择性相互作用进一步增强. 推测该混合凝胶体系的良好性能在分离复杂混合物时会得到更为充分的展示，我们正在对此进行考察.

2.3 Semi-CPAs 分离机制的分析

对凝胶电泳分离机理的阐释目前仍然是一个热点，Ogston筛分和爬行理论模型[24]认为蛋白质分子爬行在深浅不同的网络筛孔所形成的能量壁垒中，这些壁垒根据蛋白质分子大小的不同分离蛋白[25,26]. Barron提出瞬时缠绕耦合理论来解释稀释聚合物溶液中DNA的分离机制[27]. 我们分析，对于部分交联的聚合物材料，一定数量的稳定交联网络和缠绕形成的临时网络同时存在，两种孔穴都以Ogston模

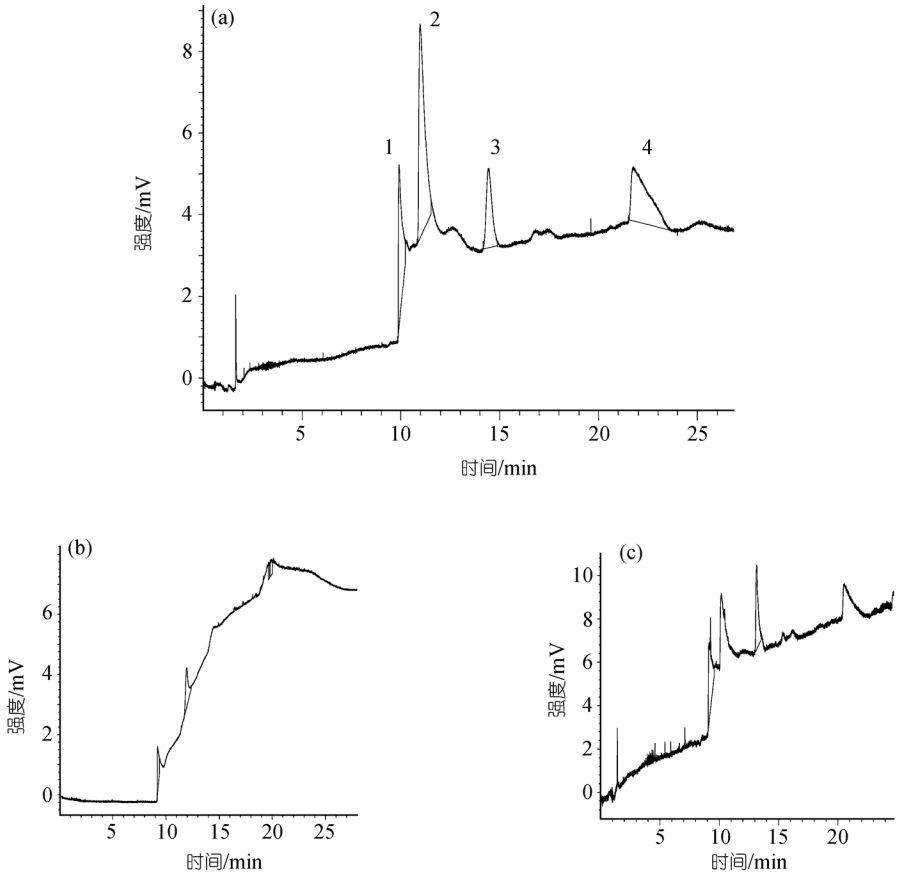


图 1

(a) 4 种碱性蛋白在含有部分交联聚合物凝胶(4%*T*-0.4%*C*)的毛细管凝胶电泳图谱，电泳条件列于本文实验部分. 对应蛋白分别是溶菌酶(1)，细胞色素 C(2)，核糖核酸酶 A(3)和胰蛋白酶(4); (b) 4 种碱性蛋白的毛细管电泳图谱，缓冲溶液中不含部分交联聚合物凝胶; (c) 4 种碱性蛋白在含有部分交联聚合物凝胶 (4%*T*-0.8%*C*)的毛细管凝胶电泳图谱，电泳分离电压为 15 kV，其余条件同(a)

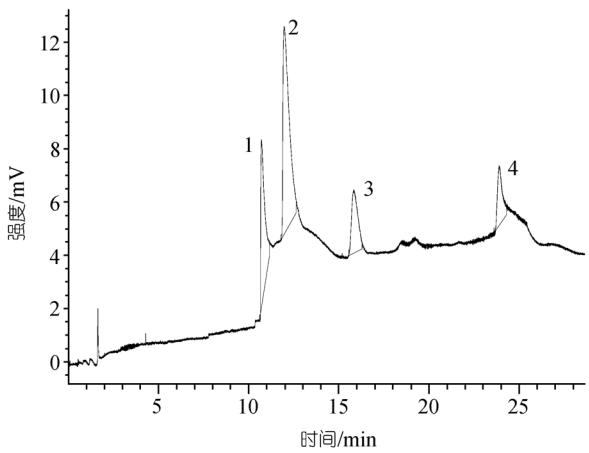


图 2　4 种碱性蛋白在含有混合部分交联聚合物凝胶 (5%*T*-0.4%*C* 和 2%*T*-0.4%*C*)的 CGE 图谱

电泳条件同图 1(a). 对应蛋白分别是溶菌酶(1)、细胞色素 C(2)、核糖核酸酶 A(3)和胰蛋白酶(4)

式筛分蛋白. 同时，溶液中未发生交联和缠绕的线性聚合物长链同样也会以瞬时缠绕耦合模式与蛋白质发生相互作用. 因此，semi-CPAs 筛分介质是处于交联凝胶和非交联线性凝胶溶液的一种中间状态，显现了独特的分离优势，比如具有值得关注的分离能力，适宜的黏度和良好的使用特性.

不同单体或交联剂配比制备的 semi-CPAs 的化学性质差别小，因此，分析不同凝胶混合后网络结构的变化相对简单. 我们借助绘制如图 3 所示的网络结构模拟分离机理：如果具有不同单体浓度但具有相同交联剂浓度的 semi-CPA (a) (图 3(a))和 semi-CPA (b) (图 3(b))混合，可能形成如图 3(c)所示的网络结构，其中 semi-CPA(a)和 semi-CPA(b)混合充分，形成具有更宽孔径范围的网孔结构. 假如两个具有相同单体浓度但不同交联剂浓度的 semi-CPA(b)和 semi-CPA(d)混

合, 这两个网络结构混合有限, 可能仍然各自独立发挥筛分分离作用, 因此整体的筛分能力只是semi-CPA (b)和 semi-CPA (d)的简单加合而不是整合协同作用. 实验证明, 采用 semi-CPA (a)和 semi-CPA (b)混合的方式配制的凝胶分离能力明显优于采用semi-CPA (b)和 semi-CPA (d)的方式混合配制的凝胶筛分体系. 随着进一步的理论和实验研究, 针对不同分离对象将不仅可以通过优化单体和交联剂浓度, 而且可以通过混合不同的 semi-CPAs 建立适宜的筛分网络结构, 实现对分离能力的灵活选择性调整.

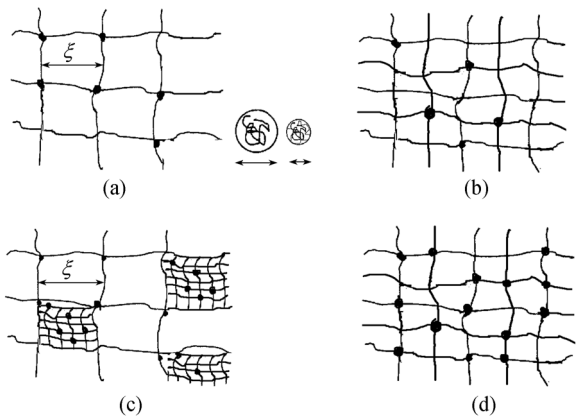


图 3 对一种或两种混配的部分交联聚合物凝胶网络结构的模拟

2.4 Semi-CPA 的管壁动态涂覆特性

选用中性物质 DMSO 作为电渗标记物, 通过计算电渗流考察 semi-CPA 的动态涂覆能力. 毛细管内壁先用聚丙烯酰胺涂层处理, 体系的电渗流为 3.5×10^{-4} $cm^2\cdot V^{-1}\cdot min^{-1}$, 如果缓冲溶液体系中含有semi-CPA, 则CGE体系的电渗流为 1.7×10^{-4} $cm^2\cdot V^{-1}\cdot min^{-1}$, 说明电渗流得到了进一步的抑制. 考察蛋白分离的重现性, 在一周时间内体系的分离能力基本没有变化, 重复进样 10 次, 迁移时间的飘移不到 1 分钟, 因此初步表明本实验体系分离碱性蛋白质的良好分离重现性. 如果仅使用聚丙烯酰胺涂层柱, 缓冲溶液中不含semi-CPA, 不仅未能实现蛋白质的分离, 而且仅一次分离完成后, 体系的分离能力便急剧下降, 基线严重漂移(图 1(b)). 严格控制聚丙烯酰胺涂层的制备过程, 可以在一定程度上改善分离的重现性以及延长毛细管涂层柱的使用寿命, 但是在semi-CPAs的参与下, 上述条件苛刻的交联涂渍过程就变得简单. 线性聚丙烯酰胺(LPA)具有较好的筛分能力, 经常得到应用, 可是LPA不具备管壁涂覆能力, 通常需要对毛细管内壁进行预涂层或者使用添加剂[28,29]. 本实验中, 单独semi-CPA也不能完成对蛋白质的最佳分离, 然而该凝胶材料在聚丙烯酰胺涂层的基础上不仅能够高分辨筛分分离蛋白质, 而且进一步减少蛋白质的吸附, 克服了涂层毛细管的不稳定、使用寿命短的缺点. 因此, 说明动态涂覆的semi-CPA与聚丙烯酰胺涂层存在协同作用, 有效地避免了蛋白质分子在毛细管内壁的非特异性吸附.

3 结论

在温和条件下, 而不是极酸极碱或有变性剂的条件下实现碱性蛋白质分子的分离是毛细管电泳技术的一个难题. 本文所使用的部分交联聚丙烯酰胺凝胶实现了溶菌酶、细胞色谱 C、核糖核酸酶 A 和胰蛋白酶 4 种碱性蛋白的基线分离, 并且重现性良好. 通过混配凝胶还可进一步提高分离度和分离柱效. 因此初步研究表明, 部分交联聚丙烯酰胺凝胶同时具有高分辨的筛分分离能力、良好的管壁动态涂层和黏度低等优点, 有望在毛细管电泳以及微流控芯片电泳中得到应用, 进而推动微通道凝胶电泳在蛋白质组学等领域中发挥更大作用.

参考文献

1 Guttman A, Cohen A S, Heiger D N, et al. Analytical and micropreparative ultrahigh resolution of oligonucleotides by polyacrylamide gel high performance capillary electrophoresis. Anal Chem, 1990, 62(2): 137—141[DOI]
2 Smith L M. High-speed DNA sequencing by capillary gel electrophoresis. Nature, 1991, 349: 812—813[DOI]
3 Baba Y, Matsuura T, Wakamoto K, et al. Preparation of polyacrylamide gel filled capillaries for ultrahigh resolution of polynucleotides by capillary gel electrophoresis. Anal Chem, 1992, 64(11): 1221—1225[DOI]
4 Doherty E A, Kan C W, Barron A E. Sparsely cross-linked "nanogels" for microchannel DNA sequencing. Electrophoresis, 2003, 24(24): 4170—4180[DOI]
5 Joann J L, Liu S R, Pu Q S. Replaceable cross-linked polyacrylamide for high performance separation of proteins in SDS-protein separation. J Proteome Res, 2005, 4(3): 1012—1016[DOI]

6 Ganzler K, Greve K S, Cohen A S, et al. Enhanced separation of DNA restriction fragments by capillary gel electrophoresis using field strength gradients. Anal Chem, 1992, 64(22): 2665—2671[DOI]

7 Best N, Arriaga E, Chen D Y, et al. Use of 6% *T* noncrosslinked polyacrylamide for DNA sequencing in capillary electrophoresis-separation of fragments up to 570 bases in length. Anal Chem, 1994, 66(22): 4063—4067[DOI]

8 Guttman A, Nolan J A, Cooke N. Capillary sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis of proteins. J Chromatogr, 1993, 632(1-2): 171—175[DOI]

9 Hu S, Zhang Z, Cook L M, et al. Separation of proteins by sodium dodecylsulfate capillary electrophoresis in hydroxypropylcellulose sieving matrix with laser-induced fluorescence detection. J Chromatogr A, 2000, 894(1-2): 291—296[DOI]

10 Sanders J C, Breadmore M C, Kwok Y C, et al. Hydroxypropyl cellulose as an adsorptive coating sieving matrix for DNA separations: Artificial neural network optimization of polymer and electrolyte conditions for microchip analysis. Anal Chem, 2003, 75(4): 986—994[DOI]

11 Buchholz B A, Doherty E A S, Albarghouthi M N. Microchannel DNA sequencing matrices with a thermally controlled viscosity switch. Anal Chem, 2001, 73(2): 157—164[DOI]

12 Chu B M, Liang D H. Copolymer solutions as separation media for DNA capillary electrophoresis. J Chromatogr A, 2002, 966(1-2): 1—13[DOI]

13 Wei W, Yeung E S. Improvements in DNA sequencing by capillary electrophoresis at elevated temperature using poly (ethylene oxide) as a sieving matrix. J Chromatogr B, 2000, 745(1): 221—230[DOI]

14 Zeng Y, Harrison D J. Self-assembled colloidal arrays as three-dimensional nanofluidic sieves for separation of biomolecules on microchips. Anal Chem, 2007, 79(6): 2289—2295[DOI]

15 Deng B, Ye N S, Luo G, et al. Separation of tissue proteins of human lung carcinomas by partial-filling capillary electrophoresis. J Nanosci Nanotech, 2005, 5: 1193—1198[DOI]

16 Zhang J, Tran N T, Weber J, et al. Poly(*N*,*N*-dimethylacrylamide)-grafted polyacrylamide: A self-coating copolymer for sieving separation of native proteins by CE. Electrophoresis, 2006, 27(5): 3086—3092 [DOI]

17 Hjertén S. High-performance electrophoresis elimination of electroendosmosis and solute adsorption. J Chromatogr, 1985, 34: 191—198[DOI]

18 Hubert S J, Slater G W, Viovy J L. Theory of capillary electrophoresis separation of DNA using ultradilute polymer solution. Macromolecules, 1996, 29: 1006—1009[DOI]

19 Liang D, Liu T, Song L, et al. Mixed triblock copolymers used as DNA separation medium in capillary electrophoresis. J Chromatogr A, 2001, 909(2): 271—278[DOI]

20 Fung E N, Yeung E S. High-speed DNA sequencing by using mixed poly(ethylene oxide) solutions in uncoated capillary columns. Anal Chem, 1995, 67: 1913—1919[DOI]

21 Wang Y, Liang D, Hao J, et al. Chemistry separation of double-stranded DNA fragments by capillary electrophoresis using polyvinylpyrrolidone and poly(*N*,*N*-dimenthylacrylamide) transient interpenetrating network. Electrophoresis, 2002, 23: 1460—1466[DOI]

22 Kan C W, Barron A E. A DNA sieving matrix with thermally tunable mesh size. Electrophoresis, 2003, 24(1-2): 55—62[DOI]

23 Zhou H H, Miller A W, Sosic Z, et al. DNA sequencing up to 1300 bases in two hours by capillary electrophoresis with mixed replaceable linear polyacrylamide solutions. Anal Chem, 2000, 72(5): 1045—1052[DOI]

24 Ogston A G. The spaces in a uniform random suspension of fibres. Trans Faraday Soc, 1958, 54: 1754—1757

25 Fu J P, Mao P, Han J Y. Nanofilter array chip for fast gel-free biomolecule separation. Appl Phys Lett, 2005, 87(263902): 1—3

26 Han J, Fu J, Schoch R B. Molecular sieving using nanofilters: Past, present and future. Lab Chip, 2008, 8(1): 23—33 [DOI]

27 Barron A E, Blanch H W, Soane D S. A transient entanglement coupling mechanism for DNA separation by capillary electrophoresis in ultradilute polymer solutions. Electrophoresis, 1994, 15(5): 597—615[DOI]

28 Chiari M, Melis A. Low viscosity DNA sieving matrices for capillary electrophoresis. Trends Anal Chem, 1998, 17(10): 623—632[DOI]

29 Wang Y C, Choi M N, Han J Y. Two-dimensional protein separation with advanced sample and buffer isolation using microfluidic valves. Anal Chem, 2004, 76: 4426—4431[DOI]