

聚合物涂层技术在毛细管电泳分离蛋白质中的应用

刘航, 王延梅*

(中国科学技术大学高分子科学与工程系, 合肥 230026)

摘要:影响毛细管电泳分离蛋白质效率和重现性的主要原因是毛细管壁对蛋白质的吸附。本文综述了解决这一问题的途径, 包括极端 pH 值法、添加小分子添加剂、对毛细管内壁改性等方法, 重点介绍并比较了用于毛细管内壁改性的两类聚合物涂层-化学键合和物理吸附的涂层。分别讨论了两类涂层在对电渗流的抑制和调节、对蛋白质吸附的阻止等方面的作用效果, 并且对同种涂覆机理下不同聚合物的涂覆效果做了相关比较。总体上说, 物理吸附的涂层比化学键合的涂层性能优越, 因此在毛细管涂覆领域更受欢迎。尽管目前该领域的工作取得了较大进展, 但仍未找到一种对所有种类蛋白质的分离都有效的普适性涂层, 因此未来的一段时间内分离复杂组分的蛋白质仍面临着挑战。

关键词:毛细管电泳; 蛋白质分离; 吸附; 聚合物涂层

毛细管电泳(CE)作为一种强有力的分析技术, 在生物工程、医学药物和食品检测等生命科学和化学所涉及的领域都显示了极其重要的应用前景, 由于 CE 的理论分离柱效与样品组分扩散系数成反比, 使其在生物大分子(如蛋白质和核酸)的分离方面应用更加广泛^[1]。1988 年 Rose 和 Jorgenson 首先提出了用毛细管电泳作蛋白质微量制备的可能性^[2], 实现了 5.0×10^{-11} mol 的蛋白质和肽的毛细管电泳提取, 从此毛细管电泳显示了其在肽、蛋白质、核苷酸、DNA 的分离分析等方面的巨大潜力, 而这样一种潜力又正好适应了各国在以生物工程、分子生物学等为代表的生命科学各个领域对各种蛋白质的分离分析和微量制备的迫切需求。但是蛋白质对毛细管内壁的吸附某种程度上限制了毛细管电泳在该领域的应用。

影响毛细管电泳分离蛋白质效率及重现性的最主要因素是毛细管壁对蛋白质的吸附, 吸附作用的大小取决于毛细管材料、蛋白质的等电点、缓冲溶液的 pH 值等多种因素。

1 毛细管内壁对蛋白质产生吸附的原因

毛细管电泳中的蛋白质吸附, 可源于疏水作用、静电作用和其它多种两相分配机制。通常情况下碱性蛋白的静电吸附最为突出, 在毛细管区带电泳中, 由于用作毛细管材料的熔融硅或石英的等电点约为 1.5, 因此, 在常用缓冲溶液的 pH 下($\text{pH}=4 \sim 8$), 管内壁的硅羟基发生解离, 使管内壁带负电荷, 随着 pH 值的升高, 解离程度增加, 当 $\text{pH} > 9$ 时解离完全。蛋白质在低于等电点时会带上正电荷, 在高于等电点时带负电荷, 若缓冲溶液的 pH 值低于蛋白质等电点, 蛋白质则吸附 H^+ 而带正电荷, 由于静电相互作用, 蛋白质与管壁发生吸附。对于碱性蛋白质(等电点 $\text{pI} > 7$), 在通常的缓冲溶液中($\text{pH}=4 \sim 8$)均显正电性, 与管内壁吸附严重, 因此对碱性蛋白的分离尤为困难, 如图 1(a)所示, 当缓冲溶液的 pH 值小于 8 时(例 $\text{pH}=4$), 蛋白质吸附 H^+ 带正电, 与毛细管壁的 $\text{Si}-\text{O}^-$ 通过静电相互作用形成吸附, 如图 1(b)所示。随着缓冲溶液 pH 值的增大, 蛋白质所带正电荷量减少; 当 pH 值增大到接近等电点时, 蛋白质显中性, 不带电; pH 值继续增大(超过等电点), 蛋白质带负电, 此时与毛细管壁的 $\text{Si}-\text{O}^-$ 产生排斥作用, 不再发生吸附。

在蛋白质的分离过程中, 硅羟基的解离会对其产生吸附, 这一现象早已被数人证实。1995 年,

基金项目: 安徽省人才开发资金(2005Z026), 部分得到国家自然科学基金资助(50373040);

作者简介: 刘航(1983-), 女, 硕士研究生, 从事功能高分子的合成及应用研究。

*通讯联系人。

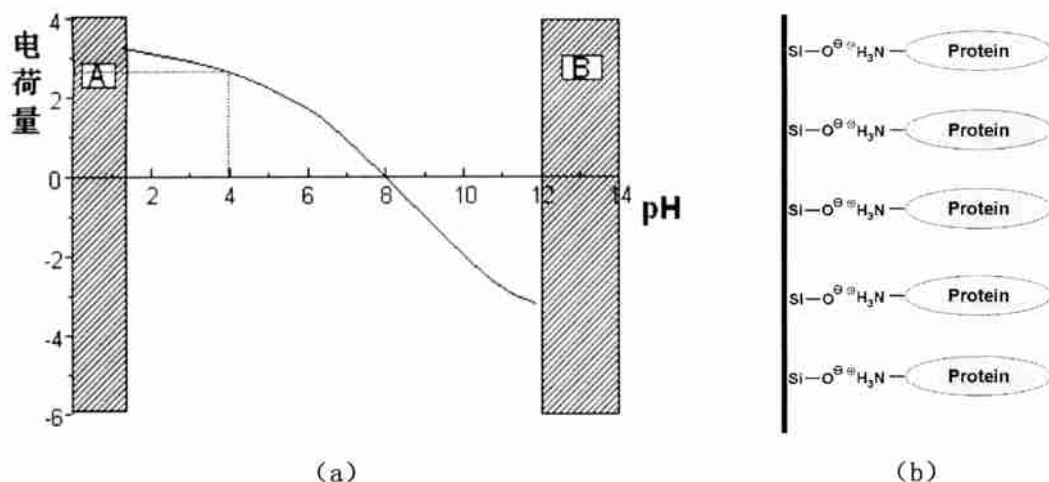


图 1 (a) 碱性蛋白质($pI=8$) 所带电荷量随 pH 的变化曲线;

(b) 在 $pH=4$ 时, 碱性蛋白质 ($pI=8$) 与毛细管壁发生吸附

Figure 1 (a) Electric charge of basic protein($pI=8$) in depending on the pH value;

(b) $pH=4$, basic protein($pI=8$) adsorbed to capillary inner surface

Kaup^[3] 用电子扫描显微镜观察到了毛细管内壁对血浆蛋白中的两种小分子药物的吸附现象, 研究发现大部分内壁不均一地吸附了一层血浆蛋白, 由此毛细管内壁 Zeta 电势的差异, 最终导致了被分离的小分子药物分离效果的下降, 重现性变差, 柱效变低。

为了抑制蛋白质的吸附, 控制电渗流(EOF), 提高分离效率, 常用的解决办法有以下几种:

2 通过改变缓冲液 pH 值及组分的方法控制蛋白质吸附

2.1 极端 pH 值法

缓冲溶液 pH 值通过影响柱壁与溶质的电荷差异, 从而改变其间的相互作用。例如, 在低 pH 下, 如图 1(a) 所示阴影 A 区域内, 硅羟基主要以不带电的质子化形式存在, 壁电荷非常小, 可以减少吸附。在高 pH 值下, 如图 1(a) 所示阴影 B 区域内, 内壁表面 Si—OH 基大部分电离带负电荷, 与溶液中带负电荷的蛋白质产生库仑排斥作用, 从而有效地抑制了管壁的吸附^[4]。

2.2 添加小分子添加剂

在 CE 分离中, 除了背景电解质外, 常常还在缓冲溶液中添加某种成分, 常用添加剂有^[5]: 表面活性剂, 如季铵盐和氟化的阳离子表面活性剂; 中性盐, 如磷酸盐、硫酸钾等; 胺类, 三乙醇胺^[6]、三乙胺、N-乙基二乙醇胺^[7]、N, N, N', N'-四甲基-1, 3 丁二胺(TMBD)^[8]等; 有机溶剂, 包括醇类、乙腈、丙酮、四氢呋喃、二甲亚砜等。

上述两种方法只能从一定程度上降低蛋白质吸附, 而且 pH 值过高(或过低), 小分子添加剂浓度过大都会导致蛋白质聚集和变性。目前最常用的方法是用聚合物对毛细管内壁进行改性处理。调节溶液 pH 值和添加小分子添加剂的方法将作为一种辅助手段, 进一步优化分离条件、提高分离选择性和分离度。

3 聚合物涂覆毛细管内壁抑制蛋白质吸附

3.1 化学键合的毛细管涂层

化学键合涂层的涂覆过程如图 2 所示, 一般分为两大步: 首先, 硅烷化试剂与毛细管内壁的 Si—OH 反应生成 Si—O—Si 结构固定在管壁内表面; 然后, 通过硅烷化试剂末端双键与适宜单体共聚生成聚合物覆盖在毛细管内表面, 形成永久涂层。

化学键合的涂层对 EOF 的抑制作用表现在以下三方面: 抑制熔硅毛细管表面 Si—OH 解离, 修饰表

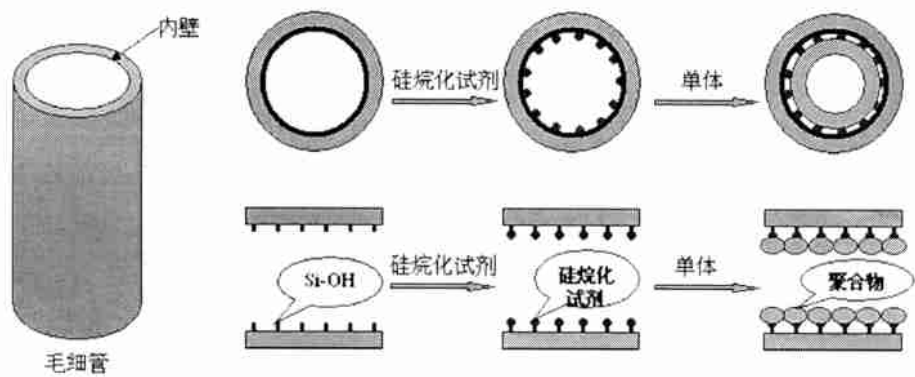


图 2 共价键合涂层的涂覆过程

Figure 2 Process of polymeric wall coating linked to capillary inner surface

面 Zeta 电势; 聚合物或硅烷化试剂的取代基覆盖已离解的 Si—OH; 增加了内壁表面层附近溶液的粘度, 涂层的厚度和密度都将影响到表面层附近溶液的粘度, 从而影响涂层的涂覆效果。常见的聚合物涂层有以下几种:

3.1.1 聚丙烯酰胺(PAA) (1) 原位聚合法 Hjertén 在 1985 年^[9] 首次报道了通过原位聚合将聚丙烯酰胺共价键合涂覆在毛细管内壁的方法。采用二官能度的 γ -(甲基丙烯酰氧基) 丙基三甲氧基硅烷(MPTS) 作为硅烷化试剂, 其中一端 Si—O—CH₃ 与 Si—OH 反应固定在毛细管内壁上, 另一端丙烯酸基团指向毛细管内部, 然后在毛细管中通入聚丙烯酰胺单体、四甲基乙二胺(TEMED)、过硫酸钾, 暴露在毛细管内表面的双键将与聚丙烯酰胺单体共聚生成线形聚丙烯酰胺(LPA)。尽管 LPA 涂层是亲水性的, 仍对电渗流起到很好的抑制作用并成功地实现了蛋白质的分离。但是, 原位聚合过程中将产生大量的未参与化学键合的聚丙烯酰胺分子链, 导致体系粘度增大, 需要加大压力才能实现对管壁的涂覆, 另外在最初的硅烷化步骤中酯键的形成降低了涂层的稳定性。

(2) 活性自由基聚合法 Cifuentes 等^[10] 证实了毛细管内壁的平整性和均一性对涂层分离效率的重要性, 用原子力显微镜对一组由原位聚合法涂覆的毛细管壁观察发现内壁光滑平整的表面较之粗糙的表面能更好地实现对碱性蛋白质的分离。粗糙表面的形成归因于原位聚合中氧对过硫酸盐分解的抑制作用。

Huang 等^[11, 12] 报道通过活性自由基聚合生成的单分散聚合物涂层, 其表面规整、性能稳定, 改进了由传统的溶液聚合方法得到的涂层, 实现了对蛋白质的高效分离。过程如下: 先用硅烷化试剂将苄基氯固定在毛细管壁上, 通过向催化剂 Cu-(bpy)₂Cl 的原子转移实现活性自由基聚合。对此法制得的线形和交联的聚丙烯酰胺研究发现, LPA 可以形成非常光滑平整的涂层, 交联的 PAA 平整性要差一些, 但都比传统溶液聚合法合成的 PAA 平整性好。无论是线形的还是交联的 PAA 都能很好地实现对蛋白质的分离, 而且涂层的稳定性好。

(3) 预聚体交联聚合法 Srinivasan 等^[13] 通过预聚体交联聚合法成功的制得了交联的 PAA 涂层, 同时对其它如聚乙烯基吡咯烷酮(PVP), 聚环氧乙烷(PEO) 也进行了同样的实验研究。首先对毛细管内壁进行硅烷化处理, 然后在毛细管中通入高分子溶液, 溶液中含有 TEMED 和过硫酸铵或其它引发剂, 于 80 °C 密闭加热 18h, 在上述条件下线形 PAA 将发生交联生成交联的 PAA。

(4) 直接键合法 毛细管不经过硅烷化处理直接与聚合物涂层键合的方法。首先将聚甲基丙烯基硅二醇铺展在毛细管内表面, 引发交联反应, 生成稳定的聚丙烯基硅二醇亚层^[14], 暴露在表面的双键将进一步与聚丙烯酰胺单体发生聚合反应。聚丙烯基硅二醇亚层的作用是增加了涂层的机械强度, 防止 PAA 在冲洗过程中剪切力的作用下被冲出毛细管。

3.1.2 聚乙烯醇(PVA) PVA 作为亲水性的涂层可以降低蛋白质的吸附, 最初是用作缓冲溶液的添加剂, 于 1994 年 Gilges 等^[15] 首次将 PVA 通过物理吸附作用涂覆在毛细管壁上, 首先在毛细管中通入 PVA 溶液, 然后将毛细管在 140 °C、氮气保护下烘干, 则 PVA 通过与 Si—OH 的化学作用在毛细管内壁覆盖了

一层永久性的结晶 PVA 涂层。

Belder 等^[19]报道了用戊二醛作交联剂,形成了稳定的交联的 PVA 涂层。首先用酸化的戊二醛冲洗毛细管,然后通入酸化的 PVA 溶液,PVA 的交联聚合发生在两相的界面上。随着交联 PVA 疏水性和粘度的增加最终沉积在管壁上,然后将毛细管在氮气氛下干燥。这种交联的涂层稳定性好,可以有效的降低电渗流,并且对碱性蛋白质显示了很好的分离效率,如图 3 所示^[19]。

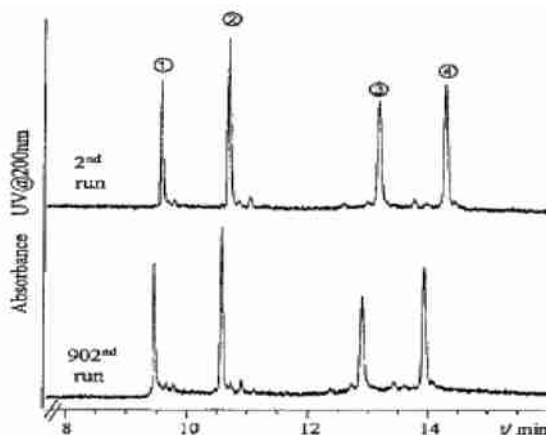


图 3 化学键合的交联的 PVA 涂层对 4 种碱性蛋白质实现第 2 次和第 902 次分离的电泳图谱

样品浓度: 50 μ g/mL 的 (1) 细胞色素 C, (2) 溶解酵素, (3) 胰蛋白酶原, (4) 胰凝乳蛋白酶原。分离条件: 毛细管, 内径 50 μ m, 总长 48.5cm(有效长度 40cm); 注入, 3 kV, 5 s; 缓冲液, 40mM 磷酸钠 分离, 309 V/cm

Figure 3 Second and 902nd run in long-term CE separations of basic proteins performed in capillaries coated with cross-linked, covalently bound PVA. Sample concentration: 50 μ g/mL each of (1) cytochrome C, (2) lysozyme, (3) trypsinogen, (4) α -chymotrypsinogen. Separation conditions: capillary, 50 μ m ID, 48.5 cm total length (40cm effective); injection, 3kV, 5s buffer, 40mM sodium phosphate; separation, 309V/cm.

3.1.3 聚乙二醇(PEG) 早在 1989 年, Bruin 等^[17]就报道了用 3-环氧丙氧丙基三甲氧基硅烷(GPTMS)作为硅烷化试剂通过化学键合将 PEG 涂覆在管壁上。Nashabeh 和 El Rassi^[18]用类似的方法得到了线形的相互缠结的 PEG。这种涂层对 EOF 的抑制作用与 PEG 的分子量直接相关,可以通过改变分子量逐步改变毛细管中 EOF 的大小。Huang 等^[19]通过在硅烷化试剂的表面吸附羟丙基纤维素(HPC)及 *N*-羟乙基-甲基丙烯酰胺(HEMA)单体的方法得到了由 HPC 与 HEMA 共聚物组成的交联层。Roopa 等^[20]报道的脂肪族环氧树脂可以在 pH 为 3~10 的范围内控制 EOF,可以实现酸/碱性蛋白质分离,理论塔板数可达 4.0×10^5 。

除上述几种常见的化学键合聚合物涂层外, Wan 等^[21]报道的通过硅烷化试剂键合的聚 *N,N*-二甲基丙烯酰胺(PDMA)涂层,以及 Robert 等^[22]报道的聚乙二醇封端硅烷化试剂的涂层都显示了较高的分离效率。

通过共价键与毛细管壁结合的涂层寿命长,稳定性好,分离效率高,已在毛细管电泳中获得广泛应用,但是化学键合的过程中涉及毛细管硅烷化和引发单体聚合两步反应,一方面受两步反应的转化率影响, Si—OH 很难被完全屏蔽;另一方面,毛细管内的聚合反应很难控制,容易造成涂层的不均一性、不规整性,甚至阻塞毛细管。

3.2 物理吸附的毛细管涂层

通过物理作用吸附在毛细管壁上的聚合物涂层相对于化学键合涂层优势在于: (1) 涂层制备过程简单易操作,涂覆过程可一步完成,如图 4 所示,比化学键合的涂层省去了硅烷化步骤,聚合物直接通过物理作用(包括氢键,静电引力和疏水基团间的相互作用)吸附在管壁上; (2) 涂层可再生。这种涂层可以是中性的、带正电荷的、也可以是吸附在带正电的聚合物涂层表面转而带负电荷的。理想的涂层应该不需要在缓冲溶液中添加有动态涂敷能力的聚合物,虽然聚合物、有机小分子、盐类等添加剂有利于毛细管电泳中蛋白质的分离,但是,这将会对目前用于蛋白质分析的主流技术——质谱仪造成污染。

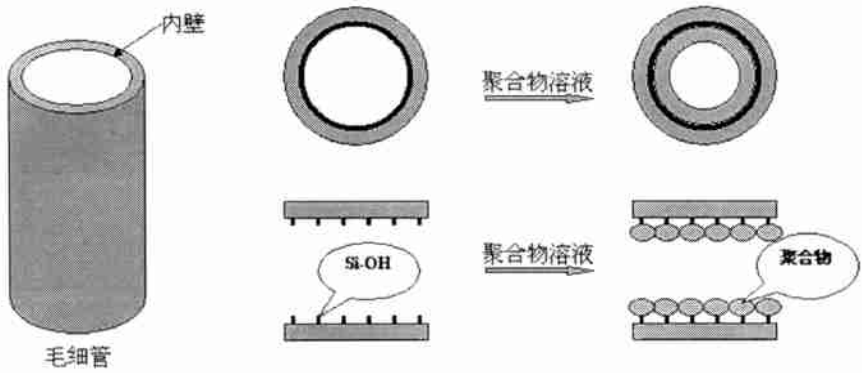


图 4 物理吸附涂层的涂覆过程

Figure 4 Process of polymeric wall coating adsorbed to capillary inner surface

Verzola 等^[23]用 SDS 将吸附在毛细管壁上的肌球蛋白解吸附来测试四种聚合物涂层的分离效率: 羟丙甲基纤维素 (HPMC) ($M_r = 1.0 \times 10^6 \text{ g/mol}$), 羟乙基纤维素 (HEC) ($M_r = 2.7 \times 10^4 \text{ g/mol}$), PVA ($M_r = 4.9 \times 10^4 \text{ g/mol}$), 聚 *N,N*-二甲基丙烯酰胺 (PDMA) ($M_r = 1.5 \times 10^5 \text{ g/mol}$)。研究发现, 没有一种聚合物涂层是可以完全屏蔽蛋白质的吸附作用, 最多只能屏蔽 50%。

中性的聚合物已经广泛用于 DNA 和其它一些生物大分子的分析, 但是由于蛋白质的吸附作用, 使得对蛋白质的分析仍有一定难度。亲水性的聚合物, 如甲基纤维素, 聚糖等不能很好的吸附在管壁上, 稳定性差^[24]。一些有一定疏水性的聚合物如聚乙基吡咯烷酮 (PVP), 聚 *N,N*-二甲基丙烯酰胺 (PDMA) 可以形成稳定的涂层, 但是由于疏水基团与蛋白质之间的相互作用使得分离效率下降。

3.2.1 聚乙烯醇 (PVA) PVA 不仅能以化学键合的形式, 也能以物理吸附的形式涂覆在毛细管壁上^[19]。将 PVA ($M_w \sim 5.0 \times 10^4 \text{ g/mol}$) 以较低浓度 (0.05%, w/w) 加入到缓冲溶液中。在用作蛋白质分析之前, 先将毛细管用上述缓冲溶液冲洗, 则在毛细管壁上吸附了一层 PVA 涂层。在 $\text{pH} < 8$ 的情况下, 这种动态涂覆的 PVA 涂层可以有效地抑制电渗流; 在 $\text{pH} > 8$ 时, EOF 开始增大, 但是仍优于未涂覆的毛细管。这种涂层比 Gilges^[19]于 1994 年合成的化学键合的涂层性能优越, 并且合成过程简单, 易操作, 但是仅限应用于 pH 较低的缓冲体系中。

Gilges^[19]将 PVA 和其它三种亲水性涂层包括右旋糖苷、HEC、HPMC 做了比较分析, 发现在碱性蛋白质分离中 PVA 的峰形不对称, 分离效率最低; HPMC 的分离效率较高, 可达 1.5×10^6 理论塔板数。右旋糖苷水溶性太强, 导致对毛细管的吸附力变弱, 这也是所有亲水性聚合物涂层共同的缺点, 由于对毛细管的吸附作用小, 只有在 $\text{pH} < 5$ 的情况下才能达到较好的分离效果。

3.2.2 聚环氧乙烷 (PEO) PEO 通过与毛细管壁的 Si-OH 形成氢键而吸附在管壁上, 可在 $\text{pH} = 3 \sim 7$ 的范围内实现对碱性蛋白质的分离^[25,26]。涂层的制备过程如下: 先用 1M 的 HCl 冲洗毛细管, 再用以 0.1M 的 HCl 配制的 PEO 溶液 (内含 0.2% (w/v), $M_r = 8.0 \times 10^6 \text{ g/mol}$ 的 PEO) 冲洗, 最后通入缓冲溶液。这种方法处理的管壁比动态涂覆法处理的管壁性能优越, 重复上述操作就可获得涂层的再生。PEO 可以有效地抑制电渗流, 在 $\text{pH} = 7$ 时可将电渗淌度 (μ_{EOF}) 降低一个数量级。这种涂层在较高 pH 下是不稳定的, 在阴极附近随着缓冲液的电解, pH 值升高, PEO 将缓慢降解。

3.2.3 聚醚 (PEO-PPO-PEO 三嵌段共聚物) 聚醚 (PEO-PPO-PEO 三嵌段共聚物) 可以有效地抑制电渗流, 提高蛋白质的分离效率^[27]。通过改变 PEO 对 PPO 嵌段长度的大小和整个共聚物的分子量, 可以得到一组不同共聚物的测试结果, 分析发现 $\text{PEO}_{129}\text{PPO}_{56}\text{PEO}_{129}$, $M_r \sim 1.4 \times 10^4 \text{ g/mol}$ 的聚醚性能最好。涂层的制备首先要对毛细管进行硅烷化处理, 以便于形成疏水表面, 有利于 PPO 嵌段的吸附, 而亲水性的 PEO 则指向内部溶液相^[28]。上述涂层在 $\text{pH} = 6$ 时可将 EOF 降低 60 倍, 在对细胞色素 *c* 的分离中理论塔板数可达 6.0×10^5 。但是, 相对于其它物理吸附涂层来说, 聚醚的制备过程耗时长, 硅烷化处理需要 3h, 聚醚

的吸附又需要 2h, 而且它的稳定性和再生能力都较差。

3.2.4 聚 *N,N*-二甲基丙烯酰胺(PDMA) PDMA 是基于丙烯酰胺类的涂层, 改善了 LPA 与毛细管壁吸附力弱的缺点, $-\text{CH}_3$ 的引入增强了涂层的疏水性, 使得涂层与毛细管壁的吸附力增强, 提高了涂层的稳定性和分离效率, PDMA 已广泛应用于蛋白质分离领域。

另一方面由于涂层的疏水性增强, 容易与蛋白质的疏水基团发生作用^[29], 导致蛋白质的吸附, 表现为谱峰拖尾现象, 分离效率降低。

3.2.5 聚羟乙基丙烯酰胺(PHEA) Albarghouthi 等^[30] 报道了一种新型的强亲水性的丙烯酰胺类聚合物 PHEA, 它可以很好地吸附在毛细管表面, 并且对蛋白质有很高的分离效率。首先用 1M 的 HCl 将管壁质子化处理, 然后通入 PHEA(0.1%, W/V), 最后用去离子水冲洗毛细管。研究发现在 pH=4.4, 分离 50 次后, EOF 可控制在 $5.3 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{V} \cdot \text{s}$ 。在对碱性蛋白质的分离中, PHEA 的分离性能不亚于化学键合的 LPA 和物理吸附的 PDMA。在对酸性蛋白质 β -乳球蛋白的分离中, PHEA 显示了比 LPA 和 PDMA 更为优越的分离性能, 如图 5 所示^[30]。

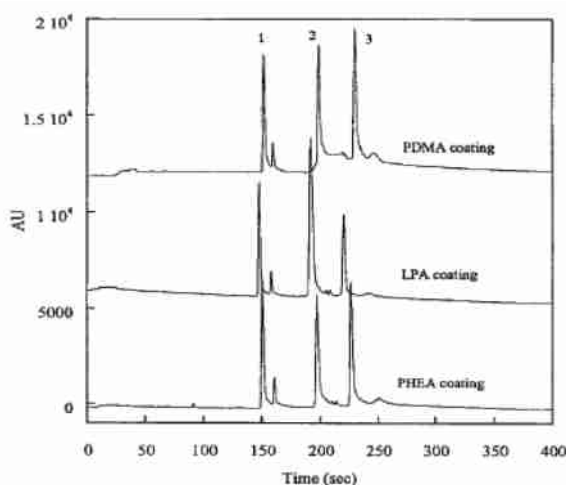


图 5 通过物理吸附 PHEA、PDMA 和化学键合 LPA 涂覆的毛细管对碱性蛋白质分离的电泳图谱

分离条件: 0.1 mg/mL 的 (1) 细胞色素 C, (2) 核糖核酸酶 A, (3) 肌球蛋白。分离条件: 毛细管, 内径 50 μm , 总长 25 cm (有效长度 20 cm); 注入, 0.5 psi, 2 s 缓冲液, 25 mM 乙酸缓冲溶液, pH 4.4; 分离, 500 V/cm; 温度 25 $^{\circ}\text{C}$ 。

Figure 5 Basic protein separation in adsorbed PHEA-, adsorbed PDMA-, and covalent LPA-coated capillaries. Sample concentration: 0.1 mg/mL each of (1) cytochrome c, (2) ribonuclease A, (3) myoglobin. Separation conditions: capillary, 50 μm ID, 25 cm total length (20 cm effective); injection, 0.5 psi, 2 s; buffer, 25 mM acetate buffer, pH 4.4; separation, 500 V/cm; temperature, 25 $^{\circ}\text{C}$.

上面讨论的中性聚合物在对酸、碱性蛋白质分离中都取得了很好的分离效果, 而带电聚合物也可以通过修饰毛细管壁表面电荷实现对电渗流的控制和蛋白质的分离。

3.2.6 聚氨基葡萄糖(Chitosan) 聚氨基葡萄糖是通过几丁质的脱乙酰化作用而得的亲水性聚电解质, 在自然界中含量颇丰, 同样廉价易得的淀粉类衍生物也见报道^[31]。Yao 和 Li^[32] 将聚氨基葡萄糖分别以动态涂覆和物理吸附的方式涂覆于毛细管壁, 分离效率可达 4.0×10^5 塔板数, 但是 pH 适用范围仅限 3.0 ~ 5.5。Huang 等^[33] 用戊二醛将 Chitosan 交联生成双层 Chitosan 结构涂覆在毛细管表面, pH 适用范围扩展到 3.0 ~ 12, 理论塔板数可达 6.0×10^5 。

3.2.7 聚阳离子 已经有多种聚阳离子通过化学键合或物理吸附的方式实现了对碱性蛋白质的分离。其中最为常见的是聚胺^[34], 已经商品化为毛细管处理剂。聚精氨酸作为动态吸附的涂层与聚胺的作用相似, 对多种碱性蛋白都实现了高分离效率, 在 pH=5 时理论塔板数超过 2.0×10^6 , 但是聚精氨酸在较高 (pH > 9) 或较低 (pH < 4) pH 值下的稳定性较差。聚乙烯亚胺(PEI)可以在较宽的 pH 值范围(3 ~ 11)保持较好稳定性, 实现对碱性蛋白的分离。高分子量极性 PEI ($M_r = 6.0 \times 10^5 \sim 1.0 \times 10^6 \text{ g/mol}$) 可在毛细管表面形成不可逆吸附, 即使在强酸或强碱作用下也不解吸附。在分离碱性蛋白时, 效率可达 $3.0 \times 10^5 \sim$

5.0×10^5 理论塔板数。

Guillaume 等^[35]开发的一种新型共聚物(*N,N*-二甲基丙烯酰胺- ω -乙基吡啶丙烯酸酰胺)(DMA-EpyM)可以通过改变缓冲液 pH 值改变涂层所带正电荷量,从而实现酸性和碱性蛋白质在同一根毛细管中的分离,理论塔板数可达 5.0×10^4 。

3.2.8 聚电解质多层吸附 通过聚电解质的多层吸附可以使得毛细管表面带上相反的电荷。Katayama 等^[36,37]用带相反电荷的聚电解质得到了电荷符号可控的表面。首先在熔硅表面吸附一层正电荷的聚胺,然后再吸附一层相反电荷的聚硫酸右旋糖苷(PDS),这样就在毛细管表面形成了负电层。带负电荷的 PDS 表面层使得 EOF 从阳极流向阴极(与未涂覆的毛细管一样),在 pH=2~11 的范围内没有 pH 依赖性,可以在酸性条件下实现蛋白质的分离,在未涂覆的毛细管中则不能实现。

进一步在原 PDS 的表面再吸附一层聚胺,这种三层吸附的聚胺表面比单层吸附的聚胺表面要稳定得多,这是因为三层吸附的聚胺与下层的阴离子相互作用力大于单层吸附的聚胺与毛细管硅羟基的作用力,从而分离效率优于单层吸附的聚胺。

4 结语

毛细管内壁的表面特性对蛋白质的 CE 行为有显著影响,对于石英毛细管,主要表现在 EOF 随 pH 和实验条件变化,以及对蛋白质的吸附作用。有许多因素可以改变毛细管内壁的表面特性,使表面硅羟基失活,文中提到的一些动态去活方法,如改变溶液 pH、加入添加剂等,在一定程度上能改变 EOF,减少吸附,但容易引起蛋白质聚集和变性。用化学键合或物理吸附方法对内壁表面进行改性处理,覆盖上一层“永久性”聚合物薄膜,能更有效地屏蔽硅羟基,减少吸附并改变 EOF,这种涂覆技术对碱性蛋白质的分离尤为有效。化学键合涂层利用硅烷化试剂的亲水基团与熔硅表面的硅羟基共价键合,然后用聚合物官能基团去活,得到稳定性较好的涂层,但制备工艺复杂,并且制备过程较难控制,涂层再生困难。物理吸附涂层稳定性虽不及化学键合涂层,但制备方法简单,可操作性强,涂层再生容易。近年来已经开发了多种聚合物用于物理吸附作用的涂层并实现了对蛋白质的高效分离,从中性聚合物,到阳离子聚电解质,再到多层吸附的聚电解质。无论聚合物涂层的稳定性还是对蛋白质的分离效率都有了显著提高,并且在不断完善发展之中,相信物理吸附的涂层将成为未来毛细管内壁改性的主要发展方向。

目前仍未找到一种对所有种类的蛋白质分离都有效的普适性涂层,因为不同种类的蛋白质等电点不同,这就需要用于管壁涂覆的聚合物涂层有较宽的 pH 适用范围,并且期望可以通过改变缓冲溶液的 pH 值实现对电渗流大小的控制,这应该是未来用于分离蛋白质的聚合物涂层的一个发展方向。

参考文献:

- [1] Christoph H. J Chromatography A, 1995, 698: 19~31.
- [2] 林炳承. 毛细管电泳导论. 北京: 科学出版社, 1996, 1~5.
- [3] Kaupp S, Steffen R, Watzig H. J Chromatogr, 1996, 744(1/2): 93~101.
- [4] McManigill D. Anal Chem, 1986, 58: 166~170.
- [5] 何金兰, 等. 高效毛细管电泳. 北京: 科学出版社, 1996, 72~75.
- [6] Verzola B, Gelfi C, Righetti P G. J Chromatogr A, 2000, 868: 85~99.
- [7] Corradini D, Cannarsa G, Fabbri E, et al. J Chromatogr A, 1995, 709: 127~134.
- [8] Corradini D, Cannarsa G. Electrophoresis, 1995, 16: 630~635.
- [9] Hjerten S. J Chromatogr, 1985, 347: 191~198.
- [10] Cifuentes A, Diez-Masa J C, Fritz, et al. Anal Chem, 1998, 70: 3458~3462.
- [11] Huang X, Wirth M J. Macromolecules, 1999, 32: 1694~1696.
- [12] Huang X Y, Doneski L J, Wirth M J. Anal Chem, 1998, 70: 4023~4029.
- [13] Srinivasan K, Pohl C, Avdalovic N. Anal Chem, 1997, 69: 2798~2805.
- [14] Schmalzing D, Piggee C A, Foret F, et al. J Chromatogr, 1993, 652: 149~159.
- [15] Gilges M, Kleemiss M H, Schomburg G. Anal Chem, 1994, 66: 2038~2046.
- [16] Belder D, Degee A, Husmann H, et al. Electrophoresis, 2001, 22: 3813~3818.

- [17] Bruin G J M, Huisden R, Kraak J C, et al. J Chromatogr, 1989, 480: 339 ~ 349.
- [18] Nashabeh W, El Rassi Z. J Chromatogr, 1991, 559: 367 ~ 383.
- [19] Huang M X, Plocek J, Novotny M V. Electrophoresis, 1995, 16: 396 ~ 401.
- [20] Roopa S S, Wang Q G, Lee M L. J Chromatogr A, 2002, 952: 267 ~ 274.
- [21] Wan H, Marcus Ohman, Lars G. J Chromatogr A, 2001, 924: 59 ~ 70.
- [22] Robert J M, Seong J, Laibinis P E, et al. Electrophoresis, 2004, 25: 405 ~ 414.
- [23] Veizola B, Gelfi C, Righetti P G. J Chromatogr A, 2000, 874: 293 ~ 303.
- [24] Madabhushi R S. Electrophoresis, 1998, 19: 224 ~ 230.
- [25] Iki N, Yeung E S. J Chromatogr A, 1996, 731: 273 ~ 282.
- [26] Preisler J, Yeung E S. Anal Chem, 1996, 68: 2885 ~ 2889.
- [27] Ng C L, Lee H K. J Chromatogr A, 1994, 659: 427 ~ 434.
- [28] Maarschalk K V, Vanderpadt A, Vantriet K. Langmuir, 1995, 11: 3068 ~ 3074.
- [29] Chiani M, Cretich M, Damini F, et al. Electrophoresis, 2000, 21: 909 ~ 916.
- [30] Albarghouthi M N, Thomas M S, Annelise E B. Electrophoresis, 2003, 24: 1166 ~ 1175.
- [31] Sakai-Kato K, Kato M, Nakajima T, et al. J Chromatogr A, 2006, 1111: 127 ~ 132.
- [32] Yao Y J, Li S F Y. J Chromatogr A, 1994, 663: 97 ~ 104.
- [33] Huang X J, Wang Q Q, Huang B L. Talanta, 2006, 69: 463 ~ 468.
- [34] Hardenborg E, Zuberovic A, Ullsten S, et al. J Chromatogr A, 2003, 1003: 217 ~ 221.
- [35] Guillaume L E. Electrophoresis, 2006, 27: 1041 ~ 1049.
- [36] Katayama H, Ishihama Y, Asakawa N. Anal Sci, 1998, 14: 407 ~ 412.
- [37] Katayama H, Ishihama Y, Asakawa N. Anal Chem, 1998, 70: 5272 ~ 5277.

Application of Polymer Coating for Protein Separation by Capillary Electrophoresis

LIU Hang, WANG Yan-mei *

(*Department of Polymer Science and Engineering, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China*)

Abstract: The main factor that influences separation efficiency and reproducibility of the protein separations by capillary electrophoresis (CE) is protein adsorption. Several methods involved in this process, including buffer pH, small molecule additives, modification of the capillary inner-wall, were discussed in this review. The focus of this review is to introduce and compare recent advances of two major classes of wall coatings for capillary ——covalently linked polymeric coatings and physically adsorbed polymeric coatings, which were used to eliminate electroosmotic flow (EOF), tune EOF and prevent protein adsorption. Comparison of performance between these two coatings was also involved in this review. In General, physically adsorbed polymeric coatings are becoming more and more popular owing to its several distinct advantages over covalently linked polymeric coatings. Although great progress has been made, there is still no universal wall coating which can function well for all types of protein analysis. The separation of complex protein samples will still be a challenge.

Key words: Capillary electrophoresis; Protein separation; Adsorption; Polymer coatings