

色谱及毛细管电泳最新研究亮点

刘 震

(南京大学化学化工学院 生命分析化学国家重点实验室, 江苏 南京 210093)



刘 震: 教授, 博士生导师。1992年7月于贵州大学化学系获理学学士学位, 1995年7月于南京大学化学化工学院获理学硕士学位, 1998年7月于中国科学院大连化学物理研究所获理学博士学位。2000年1月至2002年1月, 日本兵库大学(University of Hyogo) 日本学术振兴会(JSPS) 特别研究员。2002年8月至2005年11月, 加拿大滑铁卢大学(University of Waterloo) 博士后。2005年12月起任南京大学化学化工学院教授, 2006年3月起为博士生导师; 2008年入选教育部“新世纪人才计划”, 2011年4月起任滑铁卢大学兼职教授。第五届《色谱》杂志编委。主要研究方向: 以液相色谱、毛细管电泳和生物质谱为核心技术, 发展创新性生物分子识别、富集、分离、检测和鉴定的新原理、新技术和新方法。合著专著1本, 发表论文70余篇, SCI引用1000余次, 申请专利5项。

1 整体毛细管柱硼亲和色谱

硼亲和色谱是以取代硼酸为配基的亲合色谱模式, 主要用于顺式二羟基化合物的分离和富集。顺式二羟基化合物包括糖蛋白、糖肽、糖、核苷、核苷酸、核糖核酸(RNA)等重要生物分子。随着蛋白质组学、代谢组学和糖组学等组学研究的兴起与发展, 硼亲和色谱, 尤其是基于纳米材料和整体材料的硼亲和分离介质, 近年来受到越来越多的重视。南京大学刘震研究组系统地研究了硼亲和色谱及相关方法, 发展出一系列硼亲和磁性纳米材料(*J Chromatogr A*, 2009, 1216: 7558 ~ 7563; *Anal Bioanal Chem*, 2011, 399: 3423 ~ 3429; *Chem Commun*, 2011, 47: 2255 ~ 2257) 和一系列硼亲和整体毛细管柱(*J Chromatogr A*, 2009, 1216: 4768 ~ 4774; *Angew Chem Int Ed*, 2009, 48: 6704 ~ 6707; *J Chromatogr A*, 2009, 1216: 8421 ~ 8425), 以及硼亲和固相微萃取(*Talanta*, 2009, 79: 746 ~ 751; *Talanta*, 2010, 82: 270 ~ 276) 和基于硼亲和相互作用的毛细管电泳在线样品浓缩方法(*Talanta*, 2009, 80: 544 ~ 550)。

前不久, 该研究组报道了一种独特的硼亲和整体毛细管柱(*Chem Commun*, 2011, 47: 5067 ~ 5069)。该整体毛细管柱以4-(3-丁烯基磺基)苯硼酸(BSPBA)为功能单体, 以 N,N' -亚甲基双丙烯酰胺(MBAA)为交联剂, 通过原位自由基聚合法合成。磺基的存在使得BSPBA配基在中性pH条件下对顺式二羟基化合物具有强的亲和力。亲水性功能单体和交联剂的使用使得该整体柱具有非常高的亲水性。由于不存在疏水性相互作用, 该整体柱展现了对糖蛋白良好的专一性。该整体柱的独特性在于: 在酸性条件下洗脱时, 通过硼亲和色谱保留的顺式二羟基化合物根据其氢键相互作用能力的大小得到一定程度的分离; 而其他硼亲和整体柱则不具有这种额外的分离能力。因此使用该整体柱可以在单一色谱柱上实现二维分离。

最近, 该研究组报道了又一种新型的硼亲和整体毛细管柱(*Chem Commun*, 2011, DOI: 10.1039/c1cc11096a)。该整体柱在基柱的基础上通过后修饰合成: 首先通过原位自由基聚合法合成含有环氧基的整体毛细管, 然后用含有活性氨基的Wulff型苯硼酸频那醇酯对环氧基开环, 得到的整体柱经酸处理、除去频那醇后用中等酸性或中性水溶液活化即得到最终的整体柱。Wulff型苯硼酸对于硼亲和色谱具有重要意义, 它具有非常低的酸解离常数($pK_a = 5.2$), 可以在中等酸性条件下与顺式二羟基化合物有强的硼亲和相互作用。但具有活性反应基的Wulff型苯硼酸在合成时需要多步反应, 而且存在纯化上的困难, 目前没有商品化产品。该整体柱所用的Wulff型苯硼酸频那醇酯为自制, 利用后修饰和酸

解的技术路线从而避开了纯化上的困难。该整体柱的出现具有重要意义,因为它将硼亲和色谱的适用 pH 范围从中性降低到了中等酸性(pH 5.5),使得尿液、眼泪和唾液等 pH 可能为酸性的生理样品可以不经 pH 调节直接进行硼亲和色谱富集和分离。

2 单分散超小金纳米团簇的尺寸排阻色谱半制备分离

硫醇盐保护的金纳米团簇在纳米化学和材料科学中被广泛地研究。超小金纳米(< 2 nm)团簇和其更大的类似物(> 2 nm)相比具有截然不同的分子特征。金纳米团簇在催化、传感和药物传输等领域具有重要的应用。尺寸确定的团簇的合成具有挑战性,虽然已经取得了显著的进展,但通常得到的是多分散的混合物。尺寸聚焦法(size-focusing)是获得高度单分散团簇的重要手段,但其需要先合成多分散团簇,然后用过量硫醇进行蚀刻。瑞士日内瓦大学的 Thomas Bürgi 等利用尺寸排阻色谱实现了从多分散混合物中获得单分散超小金纳米团簇的半制备分离(*Anal Chem*, DOI: 10.1021/ac200789v)。通过重复的尺寸排阻色谱分离,可以获得仅相差两个金原子的单分散超小金纳米团簇,制备规模为 10 mg。

3 单克隆抗体 N-聚糖的毛细管电泳快速高分辨表征

蛋白质的糖基化是重要的翻译后修饰之一。糖基化的不同决定了蛋白质结构和功能的不同。抗体是重要的糖蛋白,其 Fc 区含有 N-聚糖。单克隆抗体疗法代表了生物技术工业的重要产品研发领域,其在 2011 年的市场份额预计超过 500 亿美元。N-聚糖的表征对于单克隆抗体在生产过程中的细胞系选择和质量控制具有重要作用,需要发展快速、高效、可靠和自动化的 N-聚糖表征方法。但是,由于聚糖结构的复杂性和多样性,聚糖的分析非常具有挑战性。美国东北大学的 Barry L. Karger 教授研究组最近提出了用于与单克隆抗体的功能相关的岩藻糖基化和非岩藻糖基化聚糖在高甘露聚糖存在下毛细管电泳分离的通用优化策略(*Anal Chem*, DOI: 10.1021/ac2007587)。他们的目标是分离时间小于 10 min 以保证过夜试验能处理 96 个样品。分离毛细管采用 Beckman Coulter 公司的聚丙烯酰胺涂层柱,分离主要通过改变运行缓冲溶液中的硼酸含量以调节选择性及改变线性聚丙烯酰胺的含量以改善分离柱效。在碱性条件下,硼酸作为 Lewis 酸结合顺式 1,2-或顺式 1,3-二羟基形成稳定的、带负电的五元或六元环单硼酸酯或二硼酸酯复合物。由于不同的糖基与硼酸的结合力不同,改变硼酸的含量可以调节选择性。另一方面,通过加入短链的线性聚丙烯酰胺(相对分子质量为 10 000)来增加运行缓冲溶液的黏度以降低被分离物的扩散系数,从而提高分离柱效。此外,降低毛细管柱长以提高分离电场强度可以缩短分离时间。在最佳分离条件下,12 种经常被报道的重要功能聚糖得到了快速和高分辨的分离,分离时间小于 7 min。该方法展示了非常优秀的重现性,连续运行 96 次,不使用内标,分离时间的相对标准偏差为 0.16%~1.21%,相对峰面积的标准偏差为 0.82%~3.5%。分离速度还可以通过提高柱温而加快,如将柱温提高到 35 °C,分离时间可缩短至 5 min。但由于高柱温可能影响涂层的寿命,对于大量样品不推荐使用。

4 用于完整病毒颗粒计数的病毒定量毛细管电泳法

病毒的定量分析在疫苗研发、临床诊断和环境污染分析等方面具有重要的作用。在所有这些场合,病毒样品的完整病毒颗粒(ivp)浓度或数目的测定以及降解和污染程度的估算是十分重要的。用于病毒分析的主要方法有斑块分析法和仪器分析法。斑块分析法需要 3~14 d 以形成斑块,而现有的仪器分析法则存在仪器昂贵和检测灵敏度不高等缺点。加拿大渥太华大学的 Maxim V. Berezovski 等报道了一种用于 ivp 计数的新颖毛细管电泳病毒定量法(*Anal Chem*, DOI: 10.1021/ac201006u)。该方法采用嵌入荧光染料 YOYO-1 对包封和自由的脱氧核糖核酸(DNA)进行染色,使用激光诱导荧光进行检测。通过定量比较病毒样品溶解前后病毒峰和自由 DNA 峰的变化,该方法能高分辨、高灵敏地区别 ivp 和残余 DNA,并能在很宽的动态范围($10^6 \sim 10^{12}$ ivp/mL)内对病毒进行定量分析,分析时间仅需要 5~15 min。

5 基于在线样品浓缩的细菌高灵敏毛细管电泳分析

快速检测水、食品和临床样品中的低浓度病原体细菌对于公共安全、食品安全和临床诊断具有重要的意义。在线样品浓缩是提高毛细管电泳检测灵敏度的简单而有效的手段。毛细管电泳已经广泛用于细菌的分离与分析,但用于细菌分析的在线样品浓缩则鲜有报道。法国学者 Hervé Cottet 及同事提出了一个新颖的毛细管电泳在线样品浓缩方法用于细菌的高灵敏分析(*Anal Chem*, DOI: 10.1021/ac200684t)。该方法为等速电泳模式,在场放大样品注入条件下同时进行压力和电动进样,浓缩效率达 500 倍,分析阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*)的检出限为 2×10^4 细胞/mL,分离时间小于 6 min。