

自由流电泳及其应用研究进展

屈 锋¹, 韩 彬¹, 邓玉林¹, 张丽华², 张玉奎²

(1. 北京理工大学生命科学与技术学院, 北京 100081; 2. 中国科学院大连化学物理研究所, 辽宁 大连 116023)

摘要: 对自由流电泳的分离原理、分离模式、影响分离的因素和条件以及自由流电泳仪器的发展进行了介绍, 对近年来自由流电泳在离子、小分子和微粒分离, 多肽和蛋白质分离, 细胞和细胞器分离, 药物对映体分离, 微芯片装置以及蛋白质组学等方面应用研究的进展进行了综述。引用文献 73 篇。

关键词: 自由流电泳; 应用; 进展

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2008)03-0274-06 栏目类别: 专论与综述

Free flow electrophoresis and its application development

QU Feng¹, HAN Bin¹, DENG Yulin¹, ZHANG Lihua², ZHANG Yukui²

(1. School of Life Science & Technology, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081, China;

2. Dalian Institute of Chemical Physics, the Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China)

Abstract: The principal, separation modes, influence factors and the equipment development of free flow electrophoresis (FFE) are introduced. Its latest applications on ion, small molecule and particles separation, peptides and proteins separation, cells and organelles separation, enantiomers separation, microchip device and proteomics are reviewed with cited 73 papers.

Key words: free flow electrophoresis; application; development

自由流电泳(free flow electrophoresis, FFE)是半制备型分离技术,具有可连续分离、多种分离模式、无固体支持介质和分离条件温和等优势,特别适用于生物材料的分离纯化和制备。其明显优势是使大量活性生物材料纯品的获得成为可能。FFE由Barrolier等^[1]和Hannig^[2]于上世纪五六十年代相继提出,此后20年间有大量的研究报道涉及采用FFE分离和表征免疫细胞、血细胞、骨髓细胞、肾细胞、肿瘤细胞、疟原虫、细胞器和细胞膜等^[3]。上世纪90年代中末期,生物技术的飞速发展对生物材料的分离纯化和制备技术的需求日益迫切,FFE具有的优越性使其应用更加广泛,分离样品涉及小离子、肽、酶和蛋白质、核酸、细胞膜、囊泡、细菌、病毒及各种细胞等,并可用其测量某些物理化学常数^[4]。FFE仪器也在不断地被改进更新^[5],经过近50年的发展,已发展为全自动分析仪器,应用范围从生物样品制备发展到样品分析及前处理,以及分子生物学、生物化学和细胞生物学等领域。此外,FFE在空间分离科学、芯片技术等方面的应用基础研究日渐增多,近年来FFE在蛋白质组学研究中的应用报道不断出现,其作为大量复杂蛋白质组分分析的前

处理技术以及与其他分析技术联用的有关研究正受到广泛关注。

1 自由流电泳原理及分离模式

1.1 自由流电泳原理

Roman等^[5]对FFE分离原理(见图1)进行了描述。两块平行板构成的分离室中,电场与溶液流垂直,电泳迁移率不同的组分在电场作用下与液流方向形成不同的偏转角,在分离室末端不同出口位置流出。式(1)表示影响偏转角的条件因素。

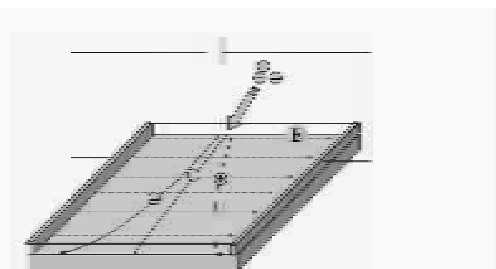


图1 自由流电泳的分离原理

Fig. 1 Principle of free flow electrophoresis (FFE)

$$\operatorname{tg}\theta = -\mu_i EA / (q\omega) \quad (1)$$

其中, θ 为偏转角; μ_i 为带电离子的电泳迁移率; E

收稿日期: 2008-01-06

通讯联系人: 屈 锋, 博士, 教授, 研究方向: 生物医学分析与检测。Tel: (010) 68914907, E-mail: qufengqu@bit.edu.cn.

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(2007CB914101)和国家自然科学基金资助项目(20377046, 20275043).

为电场强度; A 为电极表面积; q 为分离腔的横截面积; ω 为溶液的线速度。

1.2 自由流电泳分离模式

(1)自由流区带电泳(ZE-FFE) 使用组成相同的溶液使分离室内保持恒定的pH和电导值。依据分析物的质荷比,增加电压可增大组分的电泳迁移率,减小缓冲液流速可增加组分的偏转角,从而增加分离度并提高分辨效率,但可能减小分析通量。

(2)自由流等电聚焦电泳(IEF-FFE) 利用连续流动的两性电解质溶液,在分离室内的电场方向形成线性pH梯度。样品随溶液纵向流动,并在电场作用下发生横向偏转,达到其等电点处不再横向移动,被强制聚焦在某位置,不受扩散和对流的影响,仅在溶液流动方向移动。具有不同等电点的蛋白质或肽等两性物质可通过IEF-FFE达到分离。

(3)自由流等速电泳(ITP-FFE) 选用电泳迁移率最高的前导电解质和迁移率最低的尾随电解质,在不同的进样口同时进样。因样品中各组分的电泳迁移率均在前导电解质和尾随电解质之间,故使不同迁移率的样品组分夹在前导电解质和尾随电解质间并按迁移率大小排列得到分离。

(4)免疫自由流电泳(IMM-FFE) 组分通过特异性免疫反应形成复合体后具有更大的相对分子质量(M_r),且电荷性质发生改变。因此,发生免疫反应的组分具有与未发生免疫反应组分不同的质荷比,二者在分离室内的迁移速度和偏转角度形成差异而得到分离。

1.3 影响分离的理论因素和实验条件

1.3.1 影响分离的理论因素

自由流电泳是一个复杂的动态分离过程,其中影响分离效率的因素有热效应、流体力学、电动力学、电动流体力学等。

(1)热效应的影响 分离过程中电场产生焦耳热,使分离室中心和板壁处形成温度梯度,溶液入口和出口处形成温度差等。分离过程中采用的分离电压的高低、电极面积的大小、溶液的性质与流速、分离腔的宽度等均会影响热效应,如式(2)所示。

$$H = AE^2 \kappa t D \quad (2)$$

其中, H 为焦耳热; E 为电场强度; A 为电极表面积; κ 为溶液电导; t 为溶液在分离腔内的停留时间; D 为电极间距离。

(2)层流和电渗流的影响 分离室具有一定的厚度,使溶液流动时两板中心处和板壁的流速不同,导致分离室内抛物线形液流的出现。处于分离板中心的组分迁移快,板壁处的组分迁移慢,因而导致带展宽。分离室的厚度越小,层流的影响越大。由于

板壁表面还存在双电层,致使板壁产生由电极一端指向另一端的电渗流,处于板壁处的组分易受电渗流驱动,而分离室中心的样品几乎不受影响。因此板壁处的组分受相互垂直的板壁阻力和电渗流的影响,在溶液流动方向和电场方向分别受流体力学和电动力学的双重影响。

(3)电动流体力学的影响 当样品溶液的电导与周围流动溶液的电导存在差异时,电动流体力学的差异将使得样品区变形,从而导致带展宽。Rhodes等^[6,7]就此进行了讨论,当样品区的电导低于周围流动溶液的电导时,样品区出现电场方向的压缩;反之延展。若分离室内所有溶液的电导相同时,则不产生电位梯度,偏转角与溶液的电导无关。若分离室内存在的溶液电导不一致时,将存在电位梯度,组分偏转角受此影响而发生变化。

1.3.2 影响分离的实验条件

自由流电泳分离的分辨率、分离速度等还受多种实验条件的影响。优化分离室设计、控制实验条件有利于提高分离效率。

(1)分离室厚度及进样口径 适当的分离室厚度有利于热扩散,减小热对流的影响,且避免层流导致的带展宽。采用间隔0.2~0.5 mm的分离室,可获得好的散热和分离效果。样品进样口径小,组分流扩散小,带展宽小,利于提高分辨率,但降低了分离通量。

(2)流动溶液的组成和流速 使用低电导溶液产生的焦耳热低。减小流动溶液与样品溶液的电导差异可减小组分的带展宽,提高分辨率。流动溶液流速过大会导致组分在电场中的偏转角减小、分辨率降低,但可使分离室内的热对流影响减小、加快分离速度,提高分离通量。

(3)分离电压和电极尺寸 使用高电压可提高分离速度,但会导致焦耳热增大、热对流增加。电极表面积增加会增加电流,增大焦耳热。

(4)冷却系统 使用冷却系统可减小因焦耳热引起的热对流和热不稳定因素的影响。分离室外使用冷凝系统是目前控制热效应采用的主要方法。

(5)分离室板的表面处理 不同条件下针对不同分离对象,均需考虑电渗流影响。若电渗流对分离不利,可通过对分离板的内表面进行惰化处理,除去电渗流的影响。

此外,针对不同的分离样品,所用缓冲溶液的组成和性质、缓冲溶液流速与样品流速的匹配、样品入口位置、检测系统等均是需要考虑的影响因素。

2 自由流电泳仪的发展

FFE商用仪器的研制始于20世纪60~70年代

的联邦德国^[3],在其基础上,第一台商用仪器 Elphor Vap 21 面世^[5],其改进型 Elphor Vap 22 分离室高度为 0.5 ~ 1.0 mm。蛋白质和细胞样品溶液从 5 个入口进入分离室,在出口处分流进入 90 个馏分收集器^[5]。Hannig 等^[8]最先推出微型化分析型自由流电泳仪(Model ACE 710),采用小分离室(截面积 60 mm²,分离室长 4 cm),所需样品量 1 ~ 5 μ L,分离速度 30 ~ 90 s。该分离系统具有良好的稳定性和重现性,可使分离和电子光学检测实现自动化控制及数据图像实时显示。Eby^[9]曾对多种商用自由流电泳仪进行了总结。为了克服热对流、沉降、电渗流等因素的影响,曾出现了许多构思独特的装置。如 Kolin 和 Luner^[10]借助磁场作用发展的不间断液流区带电泳系统是使溶液通过内部含冷凝水的圆柱体循环冷凝。毛细管自由流电泳(CFFE)^[11,12]利用了毛细管冷凝系统将 Teflon 含氟聚合物制备的毛细管紧密排列平铺在分离腔内,当冷凝水通过毛细管时实现热交换,克服热对流及电渗流等的影响。通过增加毛细管冷凝管的层数,使热对流对分离几乎没有影响。12 mm 厚度的分离室使大量样品组分远离分离板壁,明显降低了电渗流。最具挑战和创意的想法是利用微重力解决热对流和沉降问题。空间微重力条件可阻止重力相关的热对流和样品沉降作用,允许分离室厚度增加,减小电动力学、流体力学因素对分离的影响。前苏联及美、法、日、德等发达国家研制了空间 FFE 系统,进行了大量生物材料如蛋白质、激素、细胞、脱氧核糖核酸(DNA)等的研究^[13-19]。我国在上世纪 80 年代末由中科院空间科学与应用研究中心与微生物所、上海生物化学研究所合作,在“863”计划和载人航天工程项目资助下,进行了自由流电泳仪 A3-1, A3-2 样机的研制^[20-22],用于空间和飞行条件下细胞和蛋白质的分离应用研究^[23,24]。该样机在“神舟”四号飞船上进行了微重力条件下的蛋白质分离实验^[25]。

德国是 FFE 商用仪器最早的生产国,上世纪 90 年代起市场所见的仪器均产自德国,例如 Octoput 自由流电泳仪。近年来蛋白质组学蓬勃发展,FFE 作为一种分离纯化前处理技术重新得到重视。目前针对蛋白质组学研究的全自动 FFE 商用仪器已经面世,但仪器的高售价和分离介质的高成本将是国内用户在较长时期要面对的问题。

3 自由流电泳的应用研究及进展

Hannig^[3],Bocek^[4]和 Brown^[5]分别对 FFE 的早期研究进行了综述。本文对 FFE 近十几年来的

研究进展及应用进行总结。

3.1 离子、小分子和微粒的分离

利用 FFE 分离咖啡中有机酸,发现了 6 种新组分^[26]。不同形态的 Co、Cr、As 配合物离子^[12]和两种染料苋菜红、专利蓝在含有毛细管束冷凝系统的分离室得到分离^[11]。Martynov 和 Chrambach 等^[27]分离了 6 种尺度为 73 ~ 762 nm 的带负电的聚苯乙烯微球,分离室出口处组分收集序列与微粒的迁移率相关。微球因在电场中的质荷比差异导致迁移速度不同,偏转角不同,出口处的位置不同。

3.2 多肽和蛋白质的分离

Weber 等^[28]提出了连续流电泳(CFE),利用 CFE 等电聚焦和等速电泳模式获得淀粉葡萄糖苷酶和鼠肝细胞器的高效分离。分离室中等电聚焦高分辨分离模式的实现取决于新型两性电解质的出现和有效的实验条件控制以便在分离室内形成稳定的 pH 梯度^[29-31]。Gavryushkin 等^[32]从含蜂毒肽、磷脂酶、apamin 多肽、透明质酸酶等组分的蜂蜜样品中分离出蜂毒,还从含 95% 杂蛋白的细胞溶解液中分离出 5% 的单一蛋白质组分,其纯度高达 90%,产量达 20 ~ 30 mg/h。Burggraf 等^[33]利用等电聚焦分离模式分离纯化两种人细胞溶解液中的蛋白质。样品经过等电聚焦分离后可分为 80 个馏分,馏分间组分的重叠低于 30%,为后续的二维凝胶电泳(2D-GE)、高效液相色谱分析鉴定蛋白质提供了有效的前处理方法。FFE 分离哺乳动物的垂体后叶素生长激素,可使性质相似的变体有效分离,而不同激素的变体被分离在不同馏分中,并表现出不同的活性^[34]。鼠肝过氧化物酶体膜上含高比例的碱性蛋白,而目前二维凝胶电泳对于碱性蛋白和高疏水性蛋白的分析有很大的局限。采用 IEF-FFE 可使膜蛋白上大量的碱性蛋白(等电点 $pI > 10$)获得高分辨的有效分离,并且不发生沉淀和聚集。分离收集的馏分经质谱或免疫染色鉴定,其结果表明,IEF-FFE 可选择低浓度样品,使沉淀和聚集作用降低。溶解疏水性蛋白所需的表面活性剂浓度也较低,且低浓度蛋白质样品还可再次进行分离富集。研究表明,IEF-FFE 是凝胶电泳和等电聚焦电泳的重要补充,具有一定的优越性^[35]。Schnitzhofer 等^[36]研究了 *Sclerotium rolfsii* 菌株 CBS350.80 中产生的多聚半乳糖醛酸酶(PG),采用 IEF-FFE 模式对 PG1 ($M_r = 39\,500$, $pI = 6.5$)和 PG2 ($M_r = 38\,000$, $pI = 5.4$)进行制备分离,活性测定回收率达到了 96.5%,且在相应 pH 值处均有高峰出现。FFE 与十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)联用的结果表明,FFE 不仅是一种高分辨率的制备技术,

也是一种有效的分析方法。对人血清或血浆进行不完全蛋白质组分析时,利用 FFE 对样品进行初步分离,再对收集馏分中的一小部分(如 16%)样品与质谱联用、与液相色谱-质谱联用或与高效液相色谱-电喷雾电离串联质谱(HPLC-ESI-MS/MS)联用,可对样品中的各种蛋白质进行有效鉴定,并可用于对高丰度蛋白质的去除和低丰度蛋白质的富集。研究结果表明,FFE 是复杂组分蛋白质组研究的一种很有潜力的分析方法^[37-39]。

3.3 细胞和细胞器分离

Hannig 等^[40]的研究表明,在微重力、高电导溶液条件下,兔、豚鼠、大鼠血细胞混合样品可通过特定的连续自由流电泳(CFFE)装置获得稳定的、重复性好的快速分离。因重力对 FFE 分离过程的影响很大,要获得高效分离必须克服与重力相关的因素的影响。由于多数细胞样品分离后要用于生物学研究,因此 FFE 分离过程的溶液对细胞性能的影响必须考虑。Bauer 等^[41]和 Weber 等^[42]利用分离过程中细胞质 Ca^{2+} 含量的变化研究了 FFE 电解质溶液对细胞活性的影响,结果表明,电解质溶液中含 50 mmol/L NaCl 可提高敏感细胞对分离的兼容性。采用 IMM-FFE 模式,可将牛肾核内体^[43]、Hela 癌细胞核内体^[43]、鼠肝过氧化物酶体^[44,45]、鼠肝核内体^[46]与其他细胞器分离。中性白细胞分泌囊泡与质膜融合引起各种受体和粘性蛋白传输到中性白细胞表面,FFE 可使中性白细胞分泌囊泡蛋白质与胞内质膜蛋白质分离^[47]。三乙醇胺-NaAc-50 mmol/L NaCl-蔗糖混合溶液可使培养的活性外周血淋巴细胞与经过辐射诱导的凋亡细胞分离。比较中性以及弱酸性溶液,在弱碱性条件下,凋亡淋巴细胞具有更高的迁移率,说明凋亡淋巴细胞比活性淋巴细胞的酸性更强^[48]。烟草悬浮细胞中的空泡膜或液泡以及质膜通过 FFE 纯化可被富集 4~5 倍,纯化后的馏分细胞表现出极其不同的水通透性和水通道活性^[49]。FFE 还可除去酵母粗品中的过氧化物酶体、内质网和溶酶体等,使线粒体得以提纯和富集^[50],继而进行蛋白质组学分析。

3.4 药物对映体分离

自由流电泳用于手性物质分离的相对较少。Righetti 小组^[51,52]在早期发表了固定 pH 梯度凝胶等电聚焦模式分离丹酰化异亮氨酸、丹酰化苯丙氨酸、丹酰化色氨酸等手性物质的研究结果。在分离过程中,加入 β -环糊精(β -CD)、尿素、甲醇等手性识别剂和添加剂,两种环糊精-氨基酸对映体的等电点可形成 0.1pH 差异。他们提出可利用固定化膜构成分区 pH 梯度电解池实现等电聚焦模式下的对映

体分离。Vigh 小组^[53]则对于加入非电荷手性添加剂可导致的对映体的等电点差值(ΔpI)大小提出了精确的预测关系式,并指出利用 Octopus 自由流电泳的等电聚焦模式分离对映体的可行性。通过加入羟丙基- β -环糊精作为手性识别剂,利用等电聚焦膜形成分区 pH 梯度电解池,实现丹酰化苯丙氨酸和美沙酮对映体的制备^[54,55]。通过单同分异构体和多电荷手性识别剂 heptakis-6-sulfato- β -CD, terbutaline(特布他林)药物对映体形成电荷相反但有效迁移率相同的对映体复合物,其在电场中相向移动达到有效分离,提高了有限分离宽度内的分辨率。Vigh 小组^[56,57]的研究表明,对映体分离可形成制备规模,回收率可达 95%,纯度高于 99.99%,制备速度可达 0.1~2.8 mg/h。

3.5 微芯片装置设计和应用

Raymond 和 Manz^[58,59]在 1994 和 1996 年报道了 FFE 微型分离系统。他们将 25 μL 分离腔、双排 125 个入口和出口通道、2 500 个与电极室隔离的微槽通道集成在硅芯片上。研究表明,样品分离受溶液电导影响,但焦耳热影响不明显,样品稀释程度可通过样品和溶液流速比例控制。硅芯片材料中电渗流导致带展宽并不明显,但电极室形成的气泡可导致电流中断,电极室与分离室的开放影响样品分辨率、停留时间和基线宽度。该系统分离蛋白质的通量仅为 15 $\mu\text{g}/\text{h}$,远低于商用系统 82 mg/h,但峰保留因子相近,分别为 8 和 10。他们认为,FFE 芯片系统对于样品量极少的组分分离是理想的选择,是传统高通量、连续制备型 FFE 的补充。2000 年 Tjaden 等^[60]实现了高效液相色谱与 FFE 芯片联用,完成了荧光标记的生物素与蛋白质 streptavidin 的亲分离。所用芯片材料为光学透明,通过光电倍增管可直接检测产物的荧光。通过 FFE 芯片还可去除等电聚焦过程使用的两性电解质,使分离后的组分可直接进入质谱检测系统。Chartogne 等^[61]报道了肌红蛋白、碳酸酐酶 I、 β -乳球蛋白经过 FFE 芯片等电聚焦分离并除去两性电解质后,可成功地与质谱联用直接进行检测。所设计的 FFE 芯片装置可作为等电聚焦分离与质谱检测联用的接口。Shinohara 等^[62]和 Kobayashi 等^[63]研究了微型 FFE 模块,制得的 Pyrex 玻璃材料模块尺寸为 66 mm \times 70 mm。在微模块上集成了 7 个溶液入口、3 个样品入口、19 个出口,在溶液流方向平行安置了铂电极。所用芯片材料经高分子表面处理可有效地抑制电渗流。分离后的细胞色素 C 和肌红蛋白样品经过反相高效液相色谱(RP-HPLC)分析表明分离效果良好。Matsumoto 等^[64]用计算机流体动力

学模拟方法研究了模块内受电渗流影响的温度分布情况,使数字模拟方法对微模块的设计具有指导意义。Kleparnik 等^[65]利用偏微分方程描述了芯片分离室内流体动力学因素影响的溶液传输过程。理论分析表明,样品注入快速流动的溶液流,可减少样品的对流和在分离室横向的扩散系数,获得高分辨和快速分离。通过理论计算可获得微芯片内溶液流速、分离室宽度、样品注入区宽度的最优解。Manz 等^[66]制备了 1.5 mm 普通玻璃片覆盖 0.3 mm 的聚二甲硅氧烷(PDMS)材料为基底的芯片,玻璃-PDMS 杂交芯片与微加工技术结合,可以根据需要在芯片内刻蚀 PDMS 层分离室通道或反应池,达到等电聚焦、溶液混合、化学合成及组分分离等目的,并可以与质谱检测联用。Bowser 等^[67]报道了多孔硅膜上阳极键合制成 Borofloat 玻璃基底的 FFE 微芯片方法。

FFE 芯片对于来源复杂且样品量不足的生物样品分析具有一定优势,而通过 FFE 芯片进行蛋白质分离则明显有利于后续与质谱分析仪器的联用。

3.6 蛋白质组学中的应用

将人慢性髓性白血病细胞系 K562/CR3 的细胞液通过自由流等电聚焦模式分离为 96 个馏分,其等电聚焦的 pH 范围为 3~12。其中的 35 个馏分通过胰酶酶解并经过液相色谱-质谱(LC/MS)分析,可鉴定 319 种蛋白质^[68]。FFE 分离纯化线粒体过程中,蛋白质的降解明显降低,即使用低分辨的 2D-GE 分析,可鉴定的低丰度蛋白的数量也增加 4 倍。FFE 纯化线粒体蛋白质的实验表明,其他亚细胞蛋白质对线粒体蛋白质组学分析的干扰明显降低,可鉴定出 129 种蛋白质。而通过差速离心分离,仅可鉴定出 80 种蛋白质^[50]。利用磷酸-丝氨酸特异抗体识别乳腺癌细胞中一种 M_r 为 35 000 的蛋白质时,为了减少细胞液中蛋白质组分的复杂性,连续使用 FFE、RP-HPLC、SDS-PAGE 三种分离方法后,再对提纯的蛋白质进行 *n*-ESI-MS 质谱鉴定^[69]。Simpson 和 Hoffmann 等^[70]对克隆的上皮癌细胞,通过 FFE-IEF 和 SDS-PAGE 分离其胞质蛋白,并将 RP-HPLC 与电喷雾离子阱质谱联用(ESI-IT/MS)进行鉴定。RP-HPLC 和 SDS-PAGE 联用体现了蛋白质 *pI*、疏水性和分子质量三维差异,为细胞液中复杂蛋白质组分的高通量分离和鉴定提供了有效方法。Moritz 和 Simpson 等^[38]还通过 IEF-FFE 将复杂的蛋白质组分分离为 96 个馏分,并使每份样品的差异为 0.02 pH~0.1 pH。再将 96 种馏分分别进行快速的 RP-HPLC 分析(约 6 min 内完成每个单样分析),从而构成了蛋白质等电点和蛋白质疏

水性二维分离,其一维根据蛋白质等电点分离,二维根据蛋白质的疏水性分离。再通过软件数据处理系统研究,使 IEF-FFE/RP-HPLC 二维分离可视化。该二维分离具有二维凝胶电泳的图像效果,其优于二维凝胶电泳的是不仅可分离大分子蛋白质,同时还分离凝胶电泳难以分离的小分子肽段^[71]。该二维分离方法可用于人血浆蛋白质组学研究中高丰度蛋白质的去除和低丰度蛋白质的分析^[72,73]。

4 展望

自由流电泳技术已在离子、小分子、手性物质、生物大分子等的分离、纯化、检测和鉴定等方面显示了独特的优势,具有条件温和、无基质、连续进样等特性,在生物大分子的分离制备过程中可最大限度地保持生物分子原有活性,缩短分析制备时间,降低生产成本。自由流电泳还可与其他分离制备手段结合,产生新的分离技术和方法,如双水相-自由流电泳分离。目前,发展有效的高通量、高分辨蛋白质分析技术,尽可能多的获得蛋白质组全蛋白质信息,实现高丰度蛋白质的去除和低丰度蛋白质的分离富集等研究是蛋白质组学的前沿领域,也是国内外研究者面临的共同难题。自由流电泳技术用于复杂的蛋白质分离分析具有一定的优势,其作为前处理和预分离技术与液相色谱、液相色谱-质谱、多维色谱-质谱、双向电泳等高分辨分析技术联用。自由流电泳芯片技术则具有连续流和微型化的特点,是点阵式生物芯片和通道式微流控芯片的重要补充。总之,传统的自由流电泳技术将会在生物物质分离分析和蛋白质组学、生物医学等研究领域发挥重要的作用。

参考文献:

- [1] Barrolier V J, Watzke E, Gibian H. *Z Naturforschung*, 1958, 13B: 754
- [2] Hannig K. *Z Anal Chem*, 1961, 181: 244
- [3] Hannig K. *Electrophoresis*, 1982, 3: 235
- [4] Ludmila K, Bocek P. *Electrophoresis*, 1998, 19: 1 064
- [5] Roman M C, Brown P R. *Anal Chem*, 1994, 66: 86A
- [6] Rhodes P H, Snyder R S, Roberts G O. *J Colloid Interface Sci*, 1989, 129: 78
- [7] Rhodes P H, Snyder R S, Roberts G O, et al. *Appl Theor Electrophor*, 1991, 2: 87
- [8] Hannig K, Wirth H, Shindler R K, et al. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem*, 1977, 358: 753
- [9] Eby M J. *Bio/Technology*, 1991, 9: 528
- [10] Kolin A, Luner S J. *Anal Biochem*, 1969, 30: 111
- [11] Tarnopolsky Y, Roman M, Brown P R. *Sep Sci Tech*, 1993, 28: 719
- [12] Ketterer M E, Kozerski R G E, Ritacco R, et al. *Sep Sci & Tech*, 1997, 32: 641

- [13] Hymer W C , Salada T , Cenci R , et al. *J Biotech* , 1996 , 47 : 353
- [14] Clifton M J , Roux-de Balmann H , Sanchez V , et al. *J Biotech* , 1996 , 47 : 341
- [15] Kobayashi H , Ishii N , Nagaoka S. *J Biotech* , 1996 , 47 : 367
- [16] Hannig K , Wirth H. *Prog Astron Aeron* , 1977 , 52 : 411
- [17] Hannig K , Bauer J. *Adv Space Res* , 1989 , 9(11) : 89
- [18] Bekey I , Herman D. *Prog Astron Aeron* , 1985 , 99 : 167
- [19] Liu T , Song J F , Xia Q C. *Chinese Journal of Space Science* (刘韬 , 宋金芳 , 夏其昌. 空间科学学报) , 1999 , 19 (Suppl) : 33
- [20] Wu H J , Zhou S L , Liu W X. *Chinese Journal of Space Science* (吴汉基 , 周顺林 , 刘文喜. 空间科学学报) , 1999 , 19 (Suppl) : 43
- [21] Li Q , Li L , Wang Z J , et al. *Progress in Biochemistry and Biophysics* (李钦 , 李丽 , 王兆捷 , 等. 生物化学与生物物理进展) , 1998 , 25(4) : 338
- [22] Li Q , Li L , Wang Z J , et al. *Progress in Biochemistry and Biophysics* (李钦 , 李丽 , 王兆捷 , 等. 生物化学与生物物理进展) , 1998 , 25(4) : 340
- [23] Song J F , Xia Q C. *Chinese Journal of Space Science* (宋金芳 , 夏其昌. 空间科学学报) , 1999 , 19(Suppl) : 162
- [24] Jiang Y D , Zhang Z Y , Wang H B , et al. *Chinese Journal of Space Science* (蒋远大 , 张志远 , 王海波 , 等. 空间科学学报) , 2003 , 23(3) : 233
- [25] Ding S J , Liu T , Song J F. *Chinese Journal of Space Science* (丁士健 , 刘韬 , 宋金芳. 空间科学学报) , 2004 , 24 (3) : 233
- [26] Bahre F , Maier H G. *Fresenius ' J Anal Chem* , 1996 , 355 : 190
- [27] Martynov A , Schepkina J , Chestkov V , et al. *Prep Biochem & Biotechnol* , 2000 , 30(4) : 331
- [28] Weber G , Bocek P. *Electrophoresis* , 1996 , 17 : 1 906
- [29] Weber G , Bocek P. *Electrophoresis* , 1998 , 19 : 1 649
- [30] Bier M , Ostrem J , Marques R B. *Electrophoresis* , 1993 , 14 : 1 011
- [31] Weber G , Bauer J. *Electrophoresis* , 1998 , 19 : 1 104
- [32] Loseva O I , Gavryushkin A V , Osipov V V , et al. *Electrophoresis* , 1998 , 19 : 1 127
- [33] Burggraf D , Weber G , Lottspeich F. *Electrophoresis* , 1995 , 16 : 1 010
- [34] Hymer W , Kirshnan K , Kraemer W , et al. *Electrophoresis* , 2000 , 21 : 311
- [35] Weber G , Islinger M , Weber P , et al. *Electrophoresis* , 2004 , 25 : 1 735
- [36] Schnitzhofer W , Weber H J , Vrsanska M , et al. *Enzyme and Microbial Technology* , 2007 , 40 : 1 739
- [37] Moritz R L , Clippingdale A B , Kapp E A , et al. *Proteomics* , 2005 , 5 : 3 402
- [38] Moritz R L , Ji H , Schutz F , et al. *Anal Chem* , 2004 , 76 : 4 811
- [39] Smith J C , Lambert J P , Elisma F , et al. *Anal Chem* , 2007 , 79 : 4 325
- [40] Hannig K , Kowalski M , Klock G , et al. *Electrophoresis* , 1990 , 11 : 600
- [41] Bondy B , Bauer J , Seuffert I , et al. *Electrophoresis* , 1995 , 16 : 92
- [42] Bauer J , Weber G. *Electrophoresis* , 1996 , 17 : 526
- [43] Morre D J , Morre D M , Van Alstine J M. *J Chromatogr B* , 1998 , 711 : 203
- [44] Volkl A , Mohr H , Weber G , et al. *Electrophoresis* , 1997 , 18 : 774
- [45] Mohr H , Volkl A. *Electrophoresis* , 2002 , 23 : 2 130
- [46] Ellinger I , Klapper H , Fuchs R. *Electrophoresis* , 1998 , 19 : 1 154
- [47] Sengelov H , Borregaard N. *J Immuno Met* , 1999 , 232 : 145
- [48] Chestkov V , Baibakov B , Radko S P , et al. *Electrophoresis* , 1998 , 19 : 1 211
- [49] Maurel C , Tacnet F , Guclu J , et al. *Proc Natl Acad Sci* , 1997 , 94 : 7 103
- [50] Zischka H , Weber G , Weber P J A , et al. *Proteomics* , 2003 , 3 : 906
- [51] Righetti P G , Ettori C , Chafey P , et al. *Electrophoresis* , 1990 , 11 : 1
- [52] Righetti P G , Bossi A , Wenisch E , et al. *J Chromatogr* , 1989 , 475 : 293
- [53] Glukhovskiy P , Vigh G. *Anal Chem* , 1999 , 71 : 3 814
- [54] Glukhovskiy P , Landers T A , Vigh G. *Electrophoresis* , 2000 , 21 : 762
- [55] Hoffmann P , Wagner H , Weber G , et al. *Anal Chem* , 1999 , 71 , 1 840
- [56] Glukhovskiy P , Vigh G. *Electrophoresis* , 2000 , 21 , 2 010
- [57] Glukhovskiy P , Vigh G. *Electrophoresis* , 2001 , 22 : 2 639
- [58] Raymond D E , Manz A , Widmer H M. *Anal Chem* , 1994 , 66 : 2 858
- [59] Raymond D E , Manz A , Widmer H M. *Anal Chem* , 1996 , 68 : 2 515
- [60] Mazereeuw M , de Best C M , Tjaden U R , et al. *Anal Chem* , 2000 , 72 : 3 881
- [61] Chartogne A , Tjaden U R , Greef der J V. *Rapid Commun Mass Spectrom* , 2000 , 14 : 1 269
- [62] Shinohara E , Tajima N , Suzuki H , et al. *Anal Sci* , 2001 , 17(Suppl) : 1 441
- [63] Kobayashi H , Shimamura K , Akaida T , et al. *J Chromatogr A* , 2003 , 990 : 169
- [64] Matsumoto H , Komatsubara N , Kuroda C , et al. *Chem Eng J* , 2004 , 101 : 347
- [65] Kleparnik K , Otevre M. *Electrophoresis* , 2004 , 25 : 3 633
- [66] Zhang C X , Manz A. *Anal Chem* , 2003 , 75 : 5 759
- [67] Fonslow B R , Bowser M T. *Anal Chem* , 2005 , 77 : 5 706
- [68] Wang Y , Hancock W S , Weber G , et al. *J Chromatogr A* , 2004 , 1 053 : 269
- [69] Hoffmann P , Olayioye M A , Mortiz R L , et al. *Electrophoresis* , 2005 , 26 : 1 029
- [70] Hoffmann P , Ji H , Moritz R L , et al. *Proteomics* , 2001 , 1 : 807
- [71] Moritz R L , Skandarajah A R , Ji H , et al. *Comparative and Functional Genomics* , 2005 , 6 : 236
- [72] Moritz R L , Clippingdale A B , Kapp E A , et al. *Proteomics* , 2005 , 5 : 3 402
- [73] Nissum M , Kuhfuss S , Hauptmann M , et al. *Proteomics* , 2007 , 7 : 4 218