

全柱成像毛细管技术：蛋白质和生物分析分子量和扩散系数表征的增强有力工具

扩散系数(Diffusion coefficient, D)是表征溶质分子(包括蛋白和其它生物分子)的一个重要物化参数。扩散系数除了能反映分子大小,也能反映分子形状及分子间相互作用的相关信息。目前已有多种测定蛋白质扩散系数的方法。其中包括核磁共振、动态光散射和泰勒分散等。利用这些方法测定蛋白扩散系数通常需要经纯化的蛋白。

AES的全柱成像毛细管高效蛋白质电泳仪(CEInfinite)除了可以根据蛋白质等电点不同进行快速分离和定量,也可以快速的以峰参数直接计算扩散系数和分子量大小。由于CEInfinite本身具有高分辨分离功能,在扩散系数和分子量的测定过程中,不需要纯化的蛋白。

CEInfinite测定扩散系数的原理:

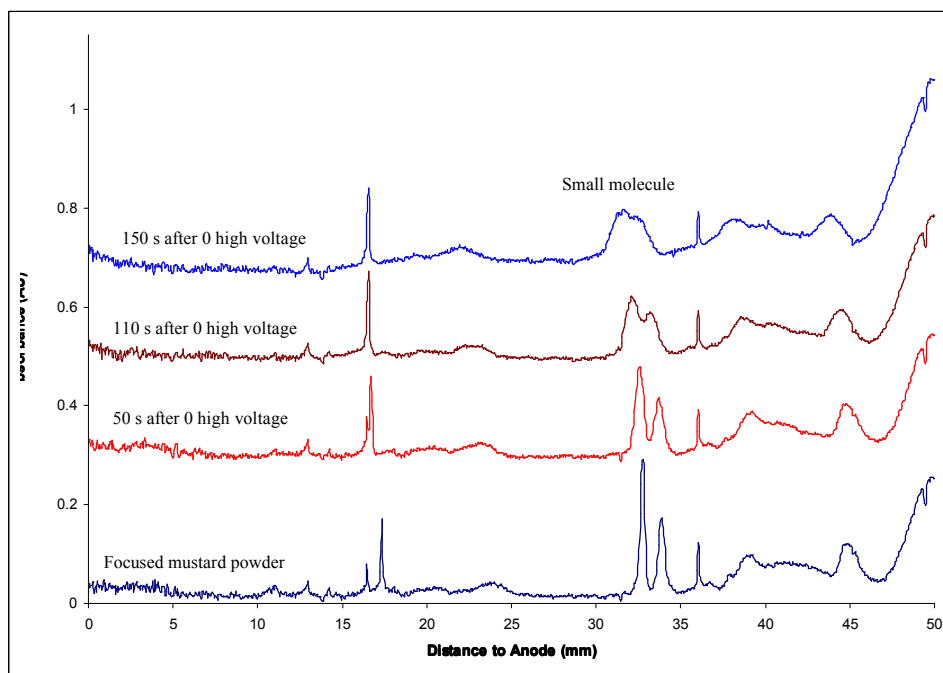
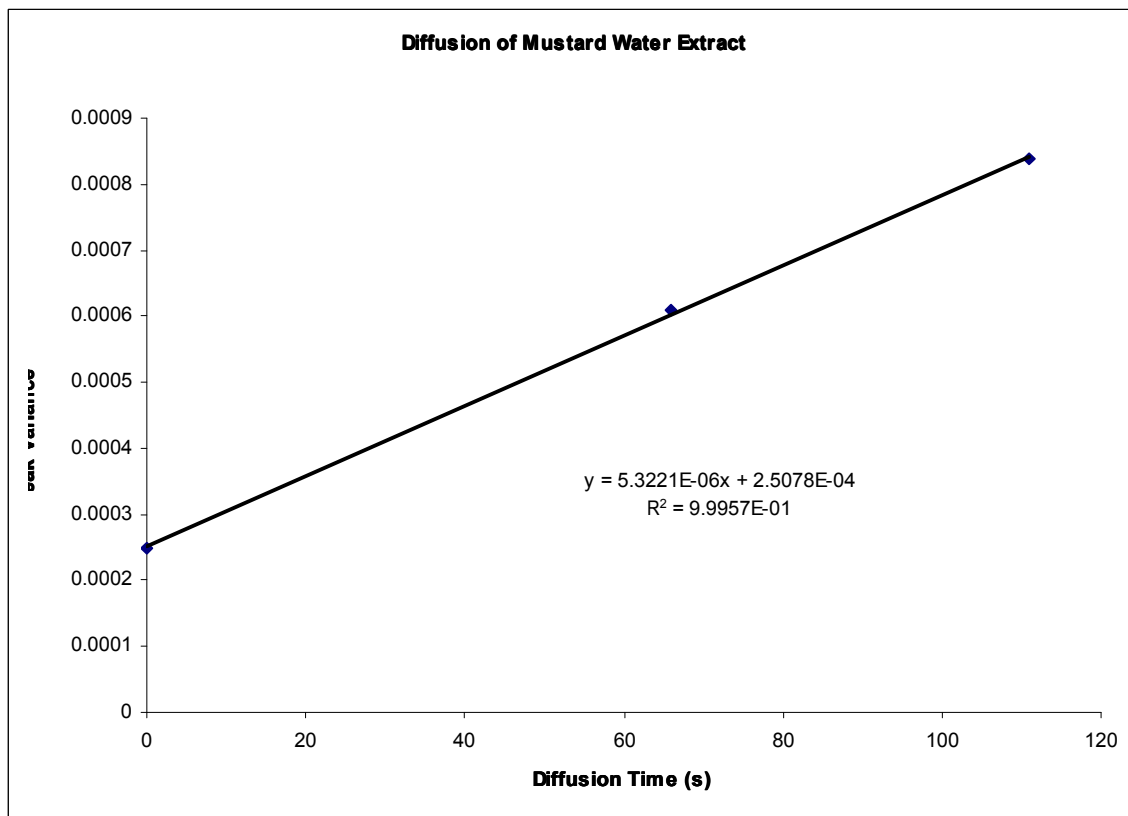


图1：北美芥末水溶物等电聚焦分离和扩散系数的测定

图1描述了CEInfinite北美芥末水溶物快速等电聚焦分离和扩散系数测定,在高电压的作用下,芥末水溶物在5分钟按等电点分离为不同的峰。然后停止分离电压,分离好的电泳峰由于分子扩散随时间增加变宽。峰宽的变异系数 σ 和半峰宽 W_h 的关系可以用公式1表示

$$W_h = 2.355\sigma \quad (1)$$

半峰宽可以直接从电泳图获得。扩散系数可以从峰宽变异系数平方对不同扩散时间 (t) 的做



图得到 (公式2) 。

图2：北美芥末水溶物小分子的扩散系数测定

$$\sigma^2 = 2Dt \quad (2)$$

CEInfinite 测定扩散系数时，是在稳态 (无移动) 条件下进行的。CEInfinite 独特的亲水涂层毛细管克服了溶质分子在毛细管壁上的吸附和作用。使用的毛细管内径小，相对于纵向，溶质在毛细管轴向的扩散可忽略。CEInfinite 的极低能耗和温度检测功能使系统恒温测定成为可能。在不同的溶质浓度测定，结合外推技术，可以测定无限稀释时蛋白质的扩散系数。由无限稀释时溶质的扩散系数可以比较准确的计算出其分子量。

CEInfinite 可以给出实验温度 (T) 。溶媒粘度系数 (η) 可以直接测定得到。溶质的分子量 (M) 可以从扩散系数和分子量的下面关系直接得到。 (Tyn, M. T.; Gusek, T. W. *Biotechnol. Bioeng.* **1990**, 35, 327-338.)

$$D = 8.34 \times 10^{-8} (T / (\eta \times M^{\frac{1}{3}})) \quad (3)$$

以北美芥末水溶物中的小分子为例，以峰宽（单位换算为厘米）变异系数的平方对时间（秒）做图，得到其扩散系数为 5.32×10^{-6} 。实验温度 300K，溶媒粘度 1cp，根据公式（3），其分子量为 104。基于同样方法，酵母酶水溶物中一溶质的扩散系数测定为 4.68×10^{-7} 。在同样的实验条件下，其分子量计算为 152800。

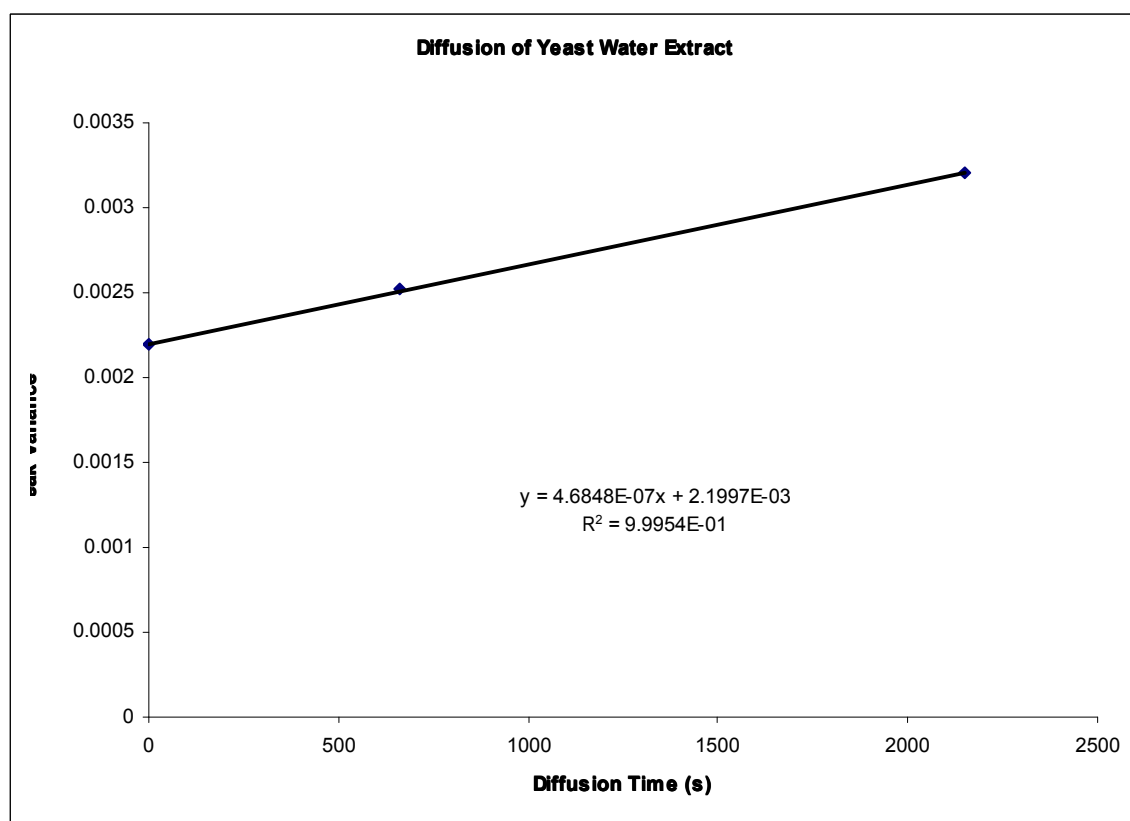


图 3：酵母酶水溶物扩散系数的测定

从图 2 和 3 可以看出，CEInfinite 可以测的分子量范围非常广。小分子的测定需要几分钟，15 万的大分子需要几十分钟。CEInfinite 的高灵敏度分离柱内径可以到 250 微米，可以满足从分子量几十的小分子到分子量几百万的疫苗和细菌的等电聚焦分离、扩散系数和分子量的测定。