



绿绵科技  
Lumiere Tech Ltd.

# 全柱成像毛细管等电聚焦电泳仪

The Speed of a Run



# 全柱成像毛细管等电聚焦电泳仪简介

## 新一代全柱成像毛细管电泳系统 (cIEF-WCID)



### 蛋白质分析的黄金技术和行业标准

蛋白质的高效分离、*pI* 点的准确测定和高通量的纯度检测是蛋白质药物和抗体药物质量控制、新药研发和蛋白质组学基础研究的重要课题。然而，凝胶介质等电聚焦电泳 (Gel IEF) 和传统的毛细管等电聚焦 (单点检测 cIEF) 存在很大局限，分析时间长、重复性差、操作繁琐，不适用于现代蛋白质基础研究和药物工业对高通量检测和高准确度的要求。Advanced Electrophoresis Solutions Ltd (AES) 是一家位于加拿大安大略省的高科技公司，在生命科学和蛋白质化学领域多年不懈努力，其最新推出的新一代毛细管电泳系统：全柱成像毛细管等电聚焦电泳技术 (cIEF-WCID)，彻底颠覆了传统电泳技术在蛋白质分析中的定义，通过 cIEF-WCID 技术，复杂蛋白质的分离和 *pI* 点的测定变得异常轻松：高分辨率、高效分离、准确 *pI* 点测定和超高分析通量 (见图一和图二) 成为蛋白质药物、抗体药物研发、质量控制、蛋白质组学基础研究和生物相互作用机制探索的强有力工具



图一：cIEF-WCID (红色)、传统单点检测毛细管电泳 (cIEF, 绿色) 和凝胶介质等电聚焦 (Gel IEF, 蓝色) 的分析时间比较

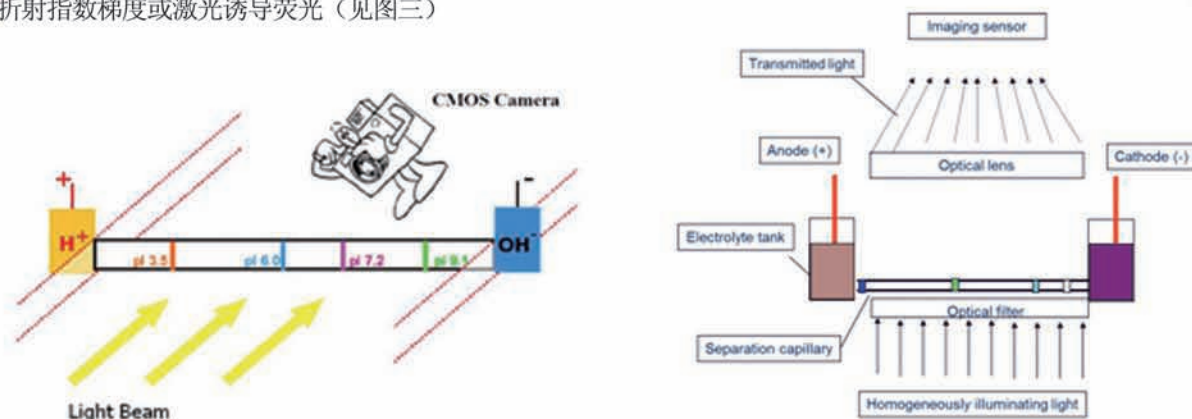
	Gel IEF	Conv. cIEF	Imaged cIEF
Labor Intensity	High	Low ✓	Low ✓
Automation	No	Yes ✓	Yes ✓
<i>pI</i> Determ & Peak ID	Inaccurate	Accurate ✓	Accurate ✓
Quantitation	Unsuitable	Suitable ✓	Suitable ✓
Resolution	Poor	Better ✓	Best ✓
Reproducibility	Poor	OK ✓	Superior ✓
<i>pI</i> Range	Narrow	Wide ✓	Very Wide ✓
Assay Runtime	Very Long	Long ✓	Short ✓
Development Time	Very Long	Long ✓	Short ✓

图二：Gel IEF、传统 cIEF 和 cIEF-WCID 的技术特点比较，cIEF-WCID 在分析通量、分辨率和重复性等方面均占突出的优势，适合于蛋白质分析的基础研究和工业化标准



# 全柱成像毛细管等电聚焦电泳仪简介

cIEF-WCID 是电荷耦合装置 (CCD) 成像技术和微分离技术发展 to 一定高度后的产物, AES 利用更为先进的 CMOS 成像技术对整个微分离通道 (长度通常为 3-8 厘米) 内的分离进行成像检测, 检测信号可以是紫外吸收、折射指数梯度或激光诱导荧光 (见图三)

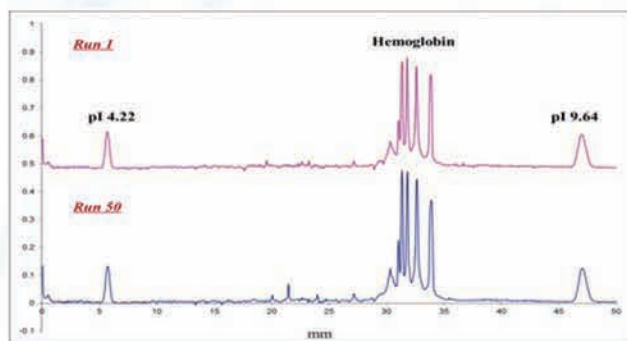


图三: cIEF-WCID 技术的高效分离、高分辨率和准确的 pI 测定, 彻底超越了传统 cIEF 的瓶颈: 即聚焦谱带必须移动通过单点检测窗口, 由此导致的低分辨率、低通量和不准确。

## AES 新一代的 cIEF-WCID 系统技术参数

AES 新一代的 cIEF-WCID 系统, 有着专利化的设计和卓越的性能, 为客户提供了蛋白质和抗体药物分析 (蛋白质药物工业和基础研究) 的强大工具:

- 1) 超高蛋白质 pI 点的分辨率 ( $\Delta pI < 0.01$ )
- 2) 超高通量的蛋白质和抗体药物分析 (分析时间  $< 10$  min)
- 3) CEInfinite 采用 CMOS (Complementary Metal-Oxide-Semiconductor Transistor, 互补性金属氧化物半导体) 作为成像检测技术, 代替了传统的 CCD 成像技术, 具有高速数据采集、宽线性范围、绿色节能、超高检测灵敏度和仪器稳定性等优势 (图四显示了蛋白分析出色的重复性, 这是工业标准的重要基础)
- 4) CE Infinite 拥有超高稳定性的自动进样系统和功能强大的操作和数据处理软件 (CE Insight, 见图五), 具有自动数据匹配、pI 值自动软件计算等功能
- 5) 目前世界上最全的 pI 标记物 (pI Marker): 31 种 pI Marker (pI point from 2.8 to 11, 见图六); 最完善的 pH 载体 (carrier ampholytes): 四种专利化独有的 Aeslytes pH 3-10、Aeslytes pH 2.5-5、Aeslytes pH 5-8 和 Aeslytes pH 8-10.5, 也可以根据客户需要, 定制高分辨的 pH 载体 (图七)
- 6) 完善和多样化的涂层毛细管 Cartridge, 极大提高了蛋白质分离的灵敏度和分辨率
- 7) 仪器的安装维护简单、快捷
- 8) 完备的蛋白质、抗体分析的解决方案和出色的售前、售后团队

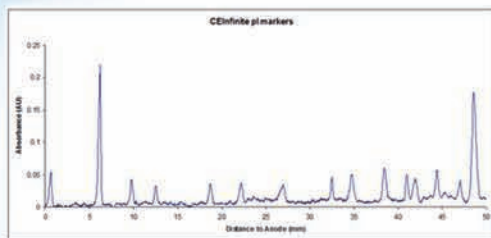


图四: cIEF-WCID 连续 50 自动进样分析出色重复性、高分辨率和准确的 pI 测定

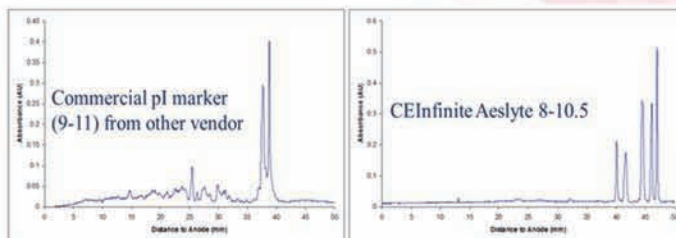


图五: 高通量、自动化和功能强大的数据采集和处理软件

# 全柱成像毛细管等电聚焦电泳仪优势

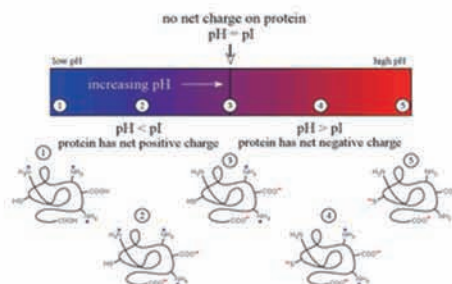


图六: AES专利化合成的高准确度和高化学稳定的pI Marker



图七: CEInfinite Aeslytes 超高分辨率的pI 载体 (具有更高的pI分辨率和稳定性)

等电点 (isoelectric point, pI) 是蛋白质的最重要理化性质之一, 其定义是当蛋白质的酸性解离与碱性解离趋势相等, 蛋白质分子净电荷为零时的环境 pH。当蛋白质分子的  $pI < \text{环境 pH}$  时带正电荷向负极移动,  $pI > \text{环境 pH}$  时带负电荷向正极移动, 处于等电点时的蛋白质在电场中既不向阳极移动, 也不向阴极移动 (见图八)



图八: 蛋白质的pI点



图九: 蛋白质复杂的空间结构, 决定其独特的pI 值和功能

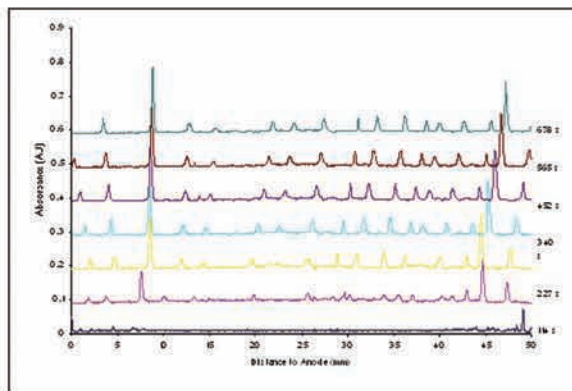
每一种蛋白质都有其特定的 pI 点, 它能反映蛋白质的空间结构、均一性以及功能性结构的变化(见图九), 准确测定 pI 值在生物化学、分子生物学、遗传学等研究中的有着重要意义: 在蛋白质纯度鉴定、分离制备蛋白质、表征蛋白质空间结构的变化、蛋白质稳定性研究、蛋白质药物质量控制、生物大分子间相互作用、抗体-抗原相互作用、蛋白质-药物相互作用、蛋白质组学等领域有着极其重要的应用

cIEF-WCID具有以下无可比拟的优势, 广泛地应用于生命科学的重要领域:

- 1) 信息量大, 样品在整个微分离通道中的分离得到动态全程检测, 能够表征生物大分子间的相互作用
- 2) 动态信息, CMOS照相机可以检测整个分离通道内各组分的动态变化 (见图十)
- 3) 简化条件优化, 分析时间缩短, 一旦样品得到满意的分离即可停止, 不必等待所有组分均流出分离通道
- 4) 可以应用于微分离通道阵列, 以达到高通量
- 5) 全柱成像检测应用于毛细管等电聚焦, 可以取消样品聚焦区带的移动步骤, 充分保持毛细管等电聚焦的高分离柱效和高分辨率

## 广泛的应用领域:

1. 蛋白质分离、纯度检测和定量分析
2. 蛋白质 pI 的测定
3. 蛋白质分子量和扩散系数的测定
4. 蛋白质的生物相互作用研究
5. 蛋白质稳定性研究
6. 蛋白质药物和抗体药物的质量控制和生产工艺研究
7. 细胞表达和蛋白质表征
8. 蛋白质纯化和制备
9. 蛋白质2-D分离和结构研究



图十: pI marker混标在cIEF-WCID分析中不同聚焦时间的分离动态监控



# 全柱成像毛细管等电聚焦电泳仪应用

**应用1: 直接、准确、快速的蛋白质 pI 点测定:** 分析时间小于10 分钟, 测定准确而且重复性出色, 常规方法难以与其相比拟 (见图1-1和图1-2)

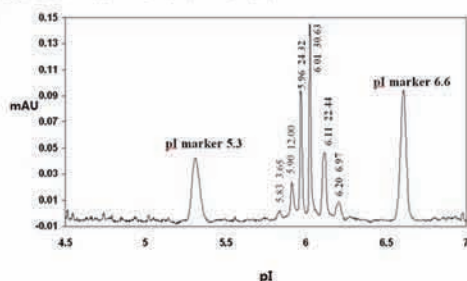


图1-1: 蛋白质药物pI点的准确测定 (均一性研究)

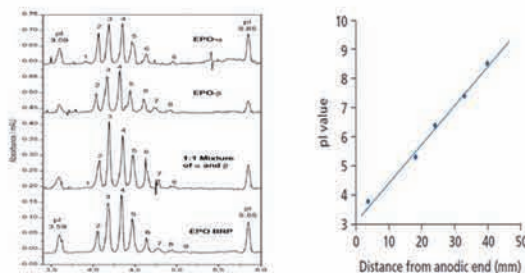


图1-2: 不同来源 EPO 的 pI 点测定 (多肽类兴奋剂的检测)

**应用2: 蛋白质分离、纯度检测和定量分析:** 蛋白质药物和抗体药物的纯度检测和质控、蛋白质纯化后的纯度监控都是工业界和蛋白质组学研究的重点, cIEF-WCID是复杂蛋白质分离的强有力手段 (图表2-1)

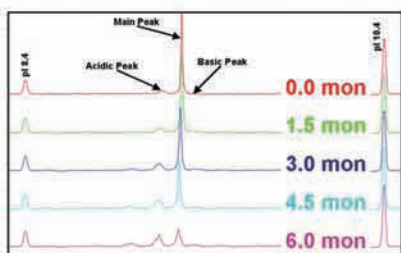


图2-1: cIEF-WCID用于蛋白质药物稳定性的考察

Intraday Precision data	Sample 1 (n=6)			Sample 2 (n=6)		
	pI of Main Peak	% Main Peak	% Acidic Peak	pI of Main Peak	% Main Peak	% Acidic Peak
Average	9.27	87.3	11.2	9.28	68.8	29.6
RSD (%)	0.1	0.4	4.0	0.0	2.4	5.9

3-days Interday Precision data	Sample 1 (n=18)			Sample 2 (n=18)		
	pI of Main Peak	% Main Peak	% Acidic Peak	pI of Main Peak	% Main Peak	% Acidic Peak
Average	9.26	87.2	11.2	9.27	69.2	29.2
RSD (%)	0.1	2.7	3.6	0.1	3.6	6.0

表2-1: 蛋白质药物主成分和降解产物的 pI 点测定和纯度考察

**应用3: 蛋白质的生物相互作用研究:** cIEF-WCID能够动态检测蛋白质和抗体药物的聚焦过程 (图3-1), 能够直接和动态监控生物大分子、蛋白质-药物之间的相互作用, 这些生物大分子的相互作用能够直接反映其功能和活性机制。抗体 (Ab)-抗原 (Ag) 的相互作用在蛋白质药物和疫苗药物的研发和工业化生产中起到非常重要的作用, 不仅能够阐明治病机制、药理机理, 而且对于蛋白质药物的质量控制和生产工艺起到决定性的作用 (图3-2) 阐明了cIEF-WCID技术在Ab-Ag相互作用研究中的应用, 其复合物能够被高分辨测定, 相互作用能够被动态表征

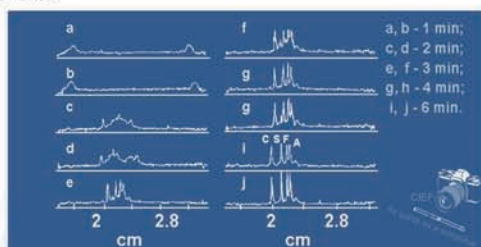


图3-1: 蛋白质和抗体药物的cIEF-WCID动态聚焦过程

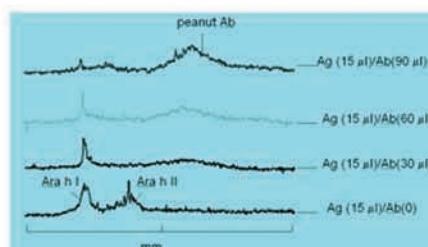


图3-2: cIEF-WCID技术用于Ab-Ag相互作用的研究

蛋白质和小分子药物的相互作用对于阐明药物的治病机理以及药理学和药物制剂的研究非常重要 (图3-3) 展示了cIEF-WCID技术研究人血红蛋白 A<sub>0</sub> 和顺铂类抗癌药物 Cisplatin 的相互作用, 随着二者相互作用时间的延长, HBA-Cisplatin 的复合物被观察到, 而且随着 Cisplatin 的比例提高到 100 倍时, 其相互作用显著增强, 复合物在相互作用时间为 3 个小时就能被显著观察到, 为不良反应监测的药物作用机制提供基础性数据

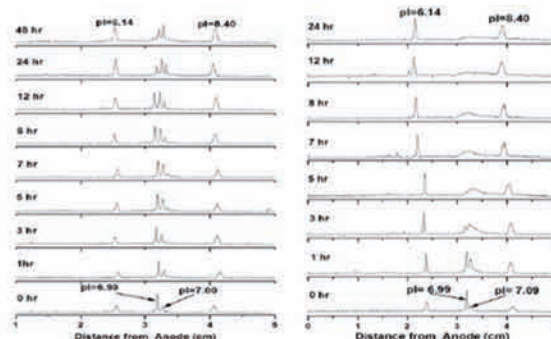


图3-3: 人血红蛋白 A<sub>0</sub> - Cisplatin 的相互作用



# 全柱成像毛细管等电聚焦电泳仪应用

蛋白质-脂质的相互作用对于药物在体内的转运、蛋白质功能的体现以及药物剂型的研究等基础科学领域发挥着重要作用，（图3-4）展示了cIEF-WCID动态监测胰蛋白酶抑制剂-PC/PS（8:2, mol%）的相互作用，二者在较低pI点区域的复合物被成功检测，而其他传统分析技术无法直接和动态观测到此类大分子之间的相互作用。钙结合蛋白在生物体内有其特殊的生理作用，在钙离子的吸收转运和生物信息的传递等方面意义重大，蛋白质-钙离子的相互作用研究能够诠释其作用机制，（图3-5）展示了cIEF-WCID研究  $\text{Ca}^{2+}$  和磷酸化酶b的相互作用，随着钙离子浓度的提高，二个不同结合部位的钙结合蛋白（在较高的pI点）能够被成功检测

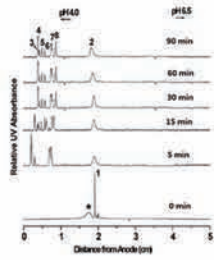
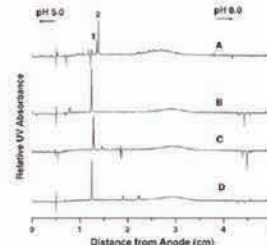
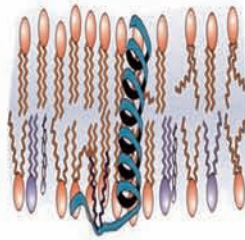


图3-4: cIEF-WCID动态检测蛋白质-磷脂复合物的形成



(A) 5.3 μM phosphorylase b + 2.4 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ;  
(B) 5.3 μM phosphorylase b + 1.6 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ;  
(C) 5.3 μM phosphorylase b + 0.8 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ;  
(D) 5.3 μM phosphorylase b + 0.0 mM  $\text{Ca}^{2+}$ .

Peaks 1 and 2 denote the  $\text{Ca}^{2+}$ -phosphorylase b conjugates from two binding sites. Two conjugates own more basic pI due to calcium binding.

图3-5: cIEF-WCID研究  $\text{Ca}^{2+}$  和磷酸化酶b的相互作用

**应用4: 蛋白质和抗体药物的稳定性对于新药研发和质控有重要意义，**（图4-1）显示了cIEF-WCID研究HbA<sub>0</sub>溶液(10 μmol/L)在37°C放置3天的稳定性，实验表明在1小时内HbA<sub>0</sub>溶液保持稳定（二个不同构象蛋白的pI点分别为7.13和7.27），1小时后HbA<sub>0</sub>发生降解，产生不同pI点的蛋白成分。（图4-2）显示了蛋白质药物在40°C放置14天和30天的稳定性考察，实验表明，在14天时，酸性杂质蛋白的含量明显提高，主成分蛋白的含量明显下降；在30天时，主成分蛋白几乎完全消失。蛋白质药物在不同的pH值溶液中的稳定性对于药物研发以及工艺研究非常重要，（图4-3）表明供研究的蛋白质药物在酸性条件下（pH<7.0）比较稳定，主成分蛋白的含量以及二个杂质蛋白质（酸性和碱性蛋白质）的含量没有明显改变，但随着pH进一步提高到碱性区（pH8和9），主成分蛋白含量明显下降，3个明显的酸性蛋白质杂质能够被观察到

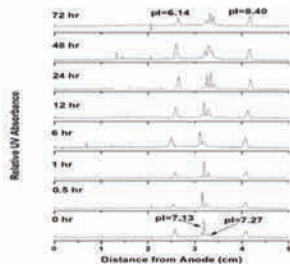


图4-1: HbA<sub>0</sub>在37°C放置3天的稳定性

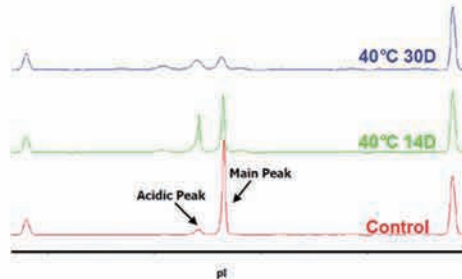


图4-2: cIEF-WCID研究蛋白质药物在40°C时的贮存稳定性

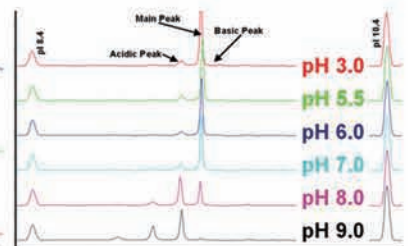


图4-3: cIEF-WCID研究蛋白质药物在不同pH值时的稳定性

**应用5: 临床化学: cIEF-WCID技术可应用到与疾病相关的蛋白和多肽生物标记物的诊断，**（图5-1）展示了肺癌和肠癌病人服用顺铂抗癌药Oxaliplatin和Cisplatin后，血清HbA<sub>0</sub>-药物复合物的表征，实验表明健康人服用顺铂抗癌药后其与HbA<sub>0</sub>复合物的表征与肺癌和肠癌患者存在明显差异，还可以应用到血液病的临床诊断（图5-2）  
**血红蛋白电泳的临床意义:**

- (A)HbA2升高，可见于维生素B12或叶酸缺乏所致的巨细胞贫血、部分轻型珠蛋白生成障碍性贫血
- (B)HbA2降低见于缺铁性贫血
- (C)HbF升高可见于纯合子β珠蛋白生成障碍性贫血、杂合子β珠蛋白生成障碍性贫血和正常新生儿
- (D)其它血液病:

- 1.主要成分为HbS，而无HbB，可见于镰形细胞血红蛋白病
- 2.HbS、HbF和HbA2轻度增加，而HbA极少或消失，结合调查可诊断为HbS-β-海洋性贫血
- 3.除HbS外，含有10%-30%HbA和轻度增高的HbF及HbA2，也可考虑HbS-β-海洋性贫血
- 4.HbS占20%-30%，HbA占65%-75%，并含有正常的HbF和HbA2，可诊断为HbS-α-海洋性贫血
- 5.HbA消失，HbC占总血红蛋白的28%-44%，可诊断为血红蛋白病，血片中可见较多的靶形细胞
- 6.有HbS，还出现HbD，血片中有靶形细胞，可诊断为血红蛋白D病
- 7.电泳结果出现HbE，可诊断为血红蛋白E病



# 全柱成像毛细管等电聚焦电泳仪应用

cIEF-WCID 还可以应用到糖尿病的临床诊断(图5-3)糖化血红蛋白控制在4%~6%,表示血糖控制正常;糖化血红蛋白控制在6%~7%,血糖控制比较理想;糖化血红蛋白控制在7%~8%,血糖控制一般;糖化血红蛋白控制在8%~9%,表示血糖控制不理想,需加强血糖控制,多注意饮食结构及运动,并在医生指导下调整治疗方案。糖化血红蛋白>9%说明血糖控制很差,会引发慢性糖尿病并发症发生。糖化血红蛋白的检测对糖尿病治疗是有很重要的作用的,所以糖尿病患者不仅要坚持血糖监测,还要定期测糖化血红蛋白,以便能更好的了解病情,进而能更好的治疗糖尿病,预防糖尿病并发症的发生

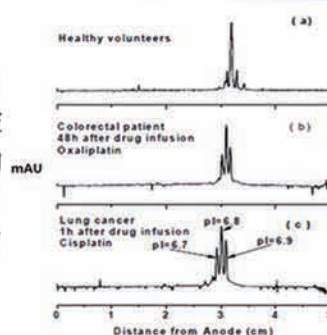


图5-1: cIEF-WCID研究顺铂抗癌药与HbA<sub>1c</sub>的相互作用

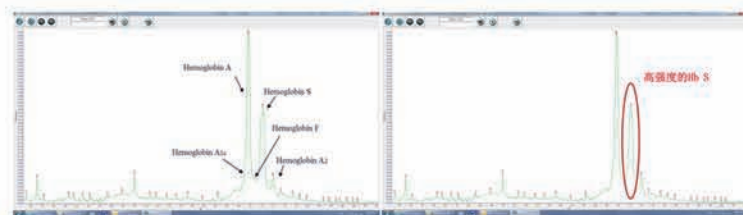


图5-2: cIEF-WCID表征血液病诊断中标志性的血红蛋白和镰形细胞血红蛋白疑似病人全血中的高强度Hb S

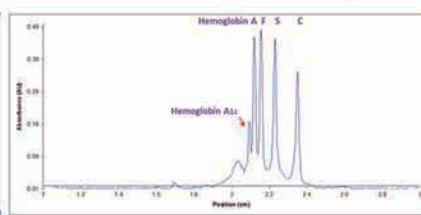


图5-3: cIEF-WCID表征糖尿病诊断中标志性的糖化血红蛋白

**应用6: cIEF-WCID可以用于蛋白质分子量和扩散系数的测定,即2D分离,见(图表6-1)**

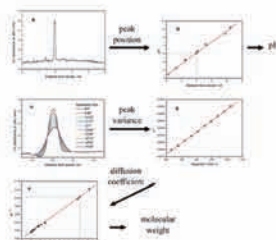


图6-1: cIEF-WCID可以用于蛋白质分子量和扩散系数的测定

Protein/peptide	M	Oligomeric state	D <sub>20</sub> (x 10 <sup>6</sup> s/cm <sup>2</sup> )	D <sub>20</sub> (x 10 <sup>6</sup> s/cm <sup>2</sup> )	Ref	M <sub>exp</sub>	Error%
Tyr-Gly-Gly	295	monomer	40.60			270	-8.4
Leucine enkephalin	556	monomer	35.80	41.00	21	600	10.8
Angiotensin II, human	1046	monomer	29.60	25.25	22	1000	0.6
Myoglobin, isoform 1 (pI = 7.2), horse heart	17000	monomer	12.50	11.3	23	13200	-20.7
Trypsinogen, bovine pancreas	24000	monomer	9.20	8.70	23	23300	-2.0
Carbonic anhydrase I, human erythrocytes	28200	monomer	9.36	10.66	23	34400	22.4
Carbonic anhydrase II, bovine erythrocytes	29250	monomer	9.27			33250	14.0
β-lactoglobulin B, bovine milk	36500	monomer	8.99	3.14	24	36100	-1.1
β-lactoglobulin A, bovine milk	36600	dimer	8.56	7.38	25	42300	14.7
Albumin, bovine serum	66000	monomer	7.75	5.90	23	63500	-4.8
Lentil lectin, isoform 1 (pI = 8.2)	90000	dimer	6.56			92600	-7.6
Lentil lectin, isoform II (pI = 8.6)	90000	dimer	6.15			114200	13.5
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, rabbit muscle	144000	tetramer	5.60	4.97	23	149000	0.4
β-amylase, sweet potato	200000	monomer	5.50	5.77	23	153900	-25.7
R. phycocyanin, red algae	240000	monomer	4.81			234900	-7.0
Urease, jack bean	272000	trimer	4.56	3.46	23	276000	-3.9

表6-1: cIEF-WCID测定目标蛋白质和多肽的扩散系数和分子量

**应用7: 蛋白质药物和抗体药物的质量控制和工艺研究:**cIEF-WCID 是蛋白质药物和抗体药物和工艺研究的强有力手段, (图7-1)表征了不同的抗体药物和治疗性蛋白质药物的成分, 为质控和工艺研究提供基础性研究数据。 (图7-2)显示了cIEF-WCID对人α绒毛膜促性腺激素单克隆抗体的质量控制, 较窄pH梯度的 ampholytes载体 (pH 4-7) 展示了超高的分辨率, 5个不同电荷均一性的蛋白能够被高效分离

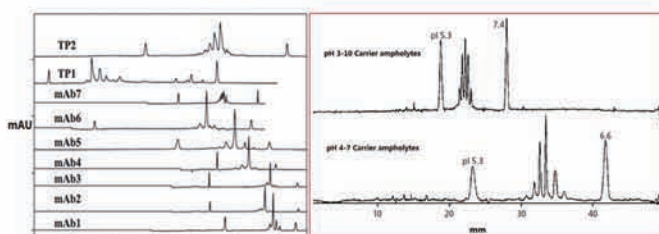


图7-1: 表征抗体药物和治疗性蛋白质药物的成分

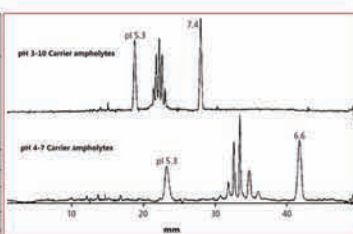


图7-2: 表征人α绒毛膜促性腺激素单克隆抗体

**应用8: cIEF-WCID是研究蛋白质结构变化研究**(图8-1)显示了cIEF-WCID用来研究胰岛素在DTT (二硫苏糖醇) 诱导还原过程的结构变化, 随着还原时间的延长, 其双硫键被破坏, 酸性蛋白的还原产物被观察到。 (图8-2)显示了cIEF-WCID研究β-乳清蛋白 B在60°C下的热稳定性, 实验表明在高温下, β-乳清蛋白 B极不稳定, 迅速变性和降解, 产生碱性降解蛋白 (峰3)。研究表明, 脂质体的加入能够显著提高蛋白质的热稳定性, 蛋白质通过插入到脂质体的疏水性双分子层, 提高了其化学稳定性, 见(图8-3)

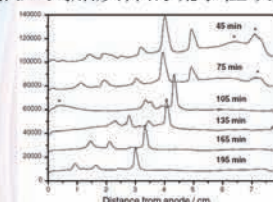


图8-1: cIEF-WCID表征胰岛素在DTT诱导还原过程

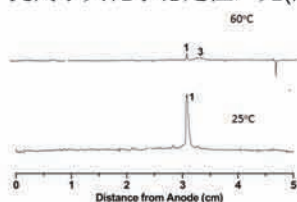


图8-2: cIEF-WCID研究β-乳清蛋白 B在60°C下的热稳定性

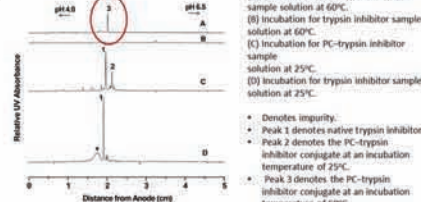


图8-3: cIEF-WCID表征脂质体对蛋白质变性的保护作用



## 应用9：食品安全、植物生理学和功能性蛋白的监测和控制

乳制品（尤其是婴儿奶粉）的质量控制和功能性蛋白的表征对于食品安全非常重要，cIEF-WCID技术在此领域有着巨大的应用空间（见图9-1和9-2）商品化酸奶显示了比脱脂奶粉更加复杂的多肽和酸性蛋白质的表征，以及丰富的菌种多样性表征。研究表明，与商品化酸奶相比，家庭自制酸奶的蛋白成分比较少，显示了比较简单的多肽和蛋白质表征，以及简单的菌种多样性（图9-3）这些差异与不同的发酵工艺紧密相关

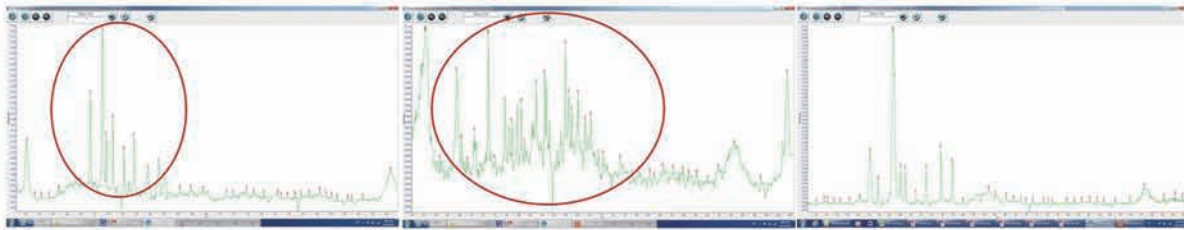


图9-1：脱脂奶粉中营养标志性蛋白的表征

图9-2：商品化酸奶中营养标志性蛋白的表征

图9-3：用于家庭自制酸奶中营养标志性蛋白的表征

婴儿奶粉中乳清蛋白是标志性的营养成分，cIEF-WCID能快速和准确的测定其中的乳清蛋白(图9-4) cIEF-WCID还用于酵母（用于发酵制作面包和馒头）和老面团中功能性蛋白的表征（图9-5和9-6），实验表明酵母样品中呈现多样化酸性蛋白的表征

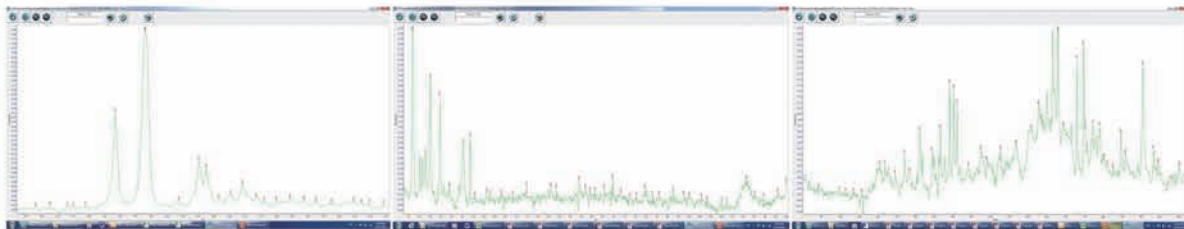


图9-4：用于婴儿奶粉中营养标志性乳清蛋白的测定

图9-5：cIEF-WCID用于酵母中功能性蛋白的表征

图9-6：cIEF-WCID用于老面团中标志性蛋白的表征

对于奶制品中营养性蛋白的控制和检测（见图9-7和9-8），样品处理简单、蛋白表征准确和高通量分析。cIEF-WCID还可以用来表征麦芽中的植物性功能蛋白质（见图9-9），是育种和植物生理学等基础性研究的强有力工具

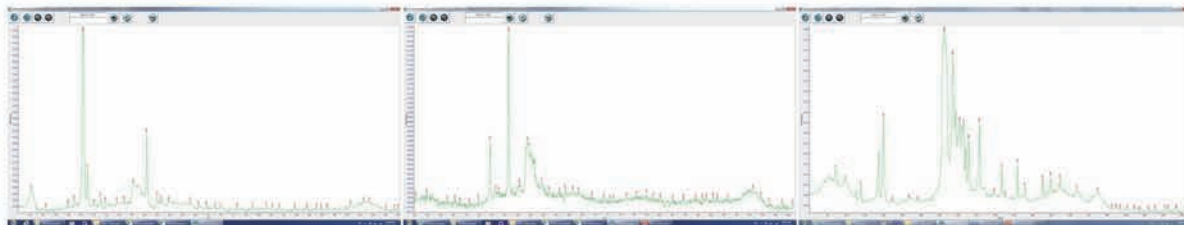


图9-7：表征奶制品酸化和离心后上清液中的乳清蛋白

图9-8：表征奶制品酸化和离心后沉淀中的乳酪蛋白

图9-9：表征麦芽中麦芽蛋白（植物性蛋白）

## 北京绿绵科技有限公司

北京总部（100080）

北京市北四环西路68号左岸工社806-807室

电话：010-8267 6061/2/3/4/5/6/7

传真：010-8267 6068

杭州技术中心（310012）

杭州市华星路嘉绿青苑5栋3单元201室

电话：0571-8890 2371/2372/2395

传真：0571-8717 8257

E-mail: info@lumtech.com.cn

Http://www.lumtech.com.cn

上海办事处（200235）

上海市徐汇区82号光大会展中心E座2601、2603室

电话：021-6432 0661

传真：021-6432 0670

西安办事处（710054）

西安市碑林区友谊东路81号天伦盛世大厦2号楼905室

电话：029-8523 6958

传真：029-8523 6958-802

河南办事处（450000）

河南省郑州市花园路39号郑州国贸中心2-2-606室

电话：0371-87095687

传真：0371-65713275