

使用 Agilent 7100 毛细管电泳系统通过毛细管凝胶电泳分析寡核苷酸

作者

Jana Boden,
ICA Boden-Haumann-Mainka,
Langen

Jens Meixner,
安捷伦科技有限公司

摘要

由于寡核苷酸迁移率相近（与链长无关），因此无法通过应用传统毛细管区带电泳（CZE），根据化合物的大小进行分离。然而，这些分析物可使用筛分基质进行分离。为了实现这一目标，将毛细管填充筛分基质（凝胶），以便根据不同分子大小迁移时间不同实现分离。在本研究中，通过分离四种不同的标样，评估了三种不同的凝胶、两种检测器滤光片和三种不同的中性涂层毛细管的分离性能。此外，还展示了因分析需要而优化分离的不同方法。

前言

本应用简报重点介绍了寡核苷酸的分析。该分析通过使用不同的参数，如不同的凝胶、滤光片、温度和电压，可以用作分析寡核苷酸样品的起点和指南。Agilent 7100 毛细管电泳系统非常适合用于毛细管凝胶电泳 (CGE)，因为它具有可编程的清洗步骤、可采用不同的波长滤光片，并且易于观察样品瓶中的填充水平。CGE 被用于此分析，因为它非常适合根据大小不同分离分析物。在优化分离参数条件下，即使长度差异只有一个单位，也可以实现分离。

实验部分

本节总结了所用的消耗品、化学品、方法及其配制方法。

材料

稳定的聚乙二醇 35000 (BHA) (8.18892) 购自 Merck (Darmstadt, Germany)。两批不同货号 (94646/BCCD4303 和 03557/BCCF4480) 的聚乙二醇 35000 均购自 Sigma-Aldrich (Darmstadt, Germany)。BisTris (0715) 购自 VWR (Darmstadt, Germany)。硼酸 (1.00165)、水 (1.15333, LC/MS 级) 和乙腈 (1.00030) 购自 Merck (Darmstadt, Germany)。使用的所有毛细管 (PVA 100 μm (G1600-60419); $\mu\text{SIL WAX 100}$ μm (197-7202); $\mu\text{SIL DNA 75}$ μm (199-2602))、滤光片 (260 nm 检测器滤光片 (G7100-62700) 和 280 nm CIEF 滤光片 (G7100-68750))、DNA 分子量标准

品 (5190-9029) 以及 RNA 分离度标准品 (5190-9028) 均购自安捷伦科技公司 (Waldbronn, Germany)。Oligo(dT)12-18 引物 (18418-012) 购自 Thermo Fisher Scientific (Dreieich, Germany)。测试混标 Polyd(A) 40-60 mer 寡核苷酸 (362387) 购自 Sciex (Darmstadt, Germany)。

方法参数

表 1 显示了采集方法的实验条件。

预处理

为防止毛细管外部和电极受到凝胶污染和粘结，预处理时应用了清洗入口电极功能，之后用水浸润 5 秒，如表 2 所示。

出于同样的原因，使用不同填充水平的样品瓶。每个电解液样品瓶中装有 1 mL 电解液，浸液样品瓶中装有约 1.3 mL 水。

凝胶样品瓶仅含 0.5 mL 凝胶。对于样品溶液，使用微量样品瓶，样品填充体积在 10 μL 到 40 μL 之间。用户必须确保进样过程中电极和毛细管浸入样品溶液中。对于所有样品瓶，必须注意确保无气泡。

通过施加外部压力，吹扫时间可以缩短至 300 秒。

电解质溶液和凝胶的配制

按照以下方法，配制电解质溶液和凝胶：

电解液：200 mmol/L BisTris，200 mmol/L 硼酸

称量 4.18 g BisTris 和 1.24 g 硼酸加入 100 mL 容量瓶，并加水至刻度。在超声水浴中约 5 分钟后，获得澄清溶液。使用前，用 0.45 μm 针头过滤器过滤溶液。

表 1. 实验条件

参数	值
设备	Agilent 7100 毛细管电泳系统
固件	B.07.021
CDS	Agilent OpenLab ChemStation C.01.10
电解液	200 mmol/L BisTris, 200 mmol/L 硼酸
毛细管	如对应章节/图所述 — 短端至 33 cm
UV 接口	“蓝色”接口 (G7100-60310)
进样	-10 kV, 10 秒; 短端测试: +10 kV, 5 秒 (或如对应图和章节所述)
检测	260 nm (BW10), 参比波长关闭 (或如图所示)
电压	-25 kV (短端测试: +25 kV) (或如图所示)
温度	30 °C

表 2. 预处理参数

功能	参数
清洗入口电极	入口: 空气 出口: 空气
冲洗	600 秒 (入口: 凝胶, 出口: 水)
载入入口瓶	水
静置	5 秒
清洗入口电极	入口: 空气 出口: 空气

聚合物溶液（凝胶）

称取 2.7 g 聚乙二醇 (PEG) 置于 10 mL 容量瓶中，并用过滤后的电解质溶液填充至刻度。为获得澄清溶液，在超声水浴中处理容量瓶至少 3 次，每次 15 分钟。在两次处理间隙，用手振摇容量瓶 5 次左右。所得凝胶含有 27% 聚合物、200 mmol/L BisTris 和 200 mmol/L 硼酸。溶液即可待用。

含 20% 乙腈的聚合物溶液（凝胶）

称取 2.7 g 聚乙二醇，转移到 10 mL 容量瓶中。加入 2 mL 乙腈，用过滤后的电解质溶液将容量瓶填充至刻度。为获得澄清溶液，在超声水浴中处理容量瓶至少 3 次，每次 15 分钟。在两次处理间隙，用手振摇 5 次左右。所得凝胶含有 27% 聚合物、20% (v:v) 乙腈、160 mmol/L BisTris 和 160 mmol/L 硼酸。溶液即可待用。

在当前测试期间，总共配制了四种凝胶：

1. **凝胶 1:** PEG, Sigma-Aldrich (货号 94646)
2. **凝胶 2:** PEG, Merck (货号 8.18892.1000)
3. **凝胶 3:** PEG, Sigma-Aldrich (货号 03557)
4. **凝胶 4:** PEG, Merck, 货号 8.18892.1000, 以及 20% 乙腈

所有凝胶在配制后都保存在冰箱 (2-8 °C) 中。在测试期间，所有凝胶使用期限为三周。也许可以储存更长时间，但尚未经过测试。

标准溶液的配制

- 标准溶液 1: DNA 分子量标准品 (安捷伦): 将 1 mL 水添加到原始样品瓶中，并将溶液涡旋混合 2 秒
- 标准溶液 2: RNA 分离度标准品 (安捷伦): 将 1 mL 水添加到原始样品瓶中，并将溶液涡旋混合 2 秒
- 标准溶液 3: Oligo(dT)12-18 引物 (Invitrogen): 样品溶液即可待用
- 标准溶液 4: 测试混标 Polyd(A) 40-60 mer 寡核苷酸 (Sciex): 将 0.5 mL 水添加到原始样品瓶中，并将溶液涡旋混合 2 秒

进样前，直接用水在微量样品瓶中按 1:2 稀释标准溶液 1、2、4 (如 20 μ L 水 + 20 μ L 标准溶液)，并涡旋混合约 2 秒。样品溶液 3 使用前按 1:10 用水稀释。即，将 3 μ L 样品添加到 27 μ L 水中，并涡旋混合 2 秒。图中给出了其他稀释倍数。

结果与讨论

在接下来的章节中，将研究以下几点：

- DAD 滤光片的影响
- 凝胶种类的影响
- 使用不同种类的毛细管的分离
- 连续进样的重现性
- 不同毛细管长度的影响
- 温度和电压的影响

使用 260 nm、280 nm 滤光片以及不使用波长滤光片的测试

前几次测试是在没有 DAD 滤光片的情况下完成的。将凝胶 1 和 2 用于 PVA 毛细管，并在短端 (8 cm) 和长距离 (24 cm) 毛细管上进行分离。从图 1 中可以看出，标准溶液 1 的六个峰是可检测到的。在下一步中，使用滤光片进行测量。为此，在 DAD 前依次安装了 260 nm 滤光片和 280 nm 滤光片，并在每种情况下使用凝胶 1 和 PVA 毛细管测试所有标准溶液。图 1 针对所有三种检测选项比较了标准溶液 1 的结果。使用所有三种检测方法，原则上可检测出六个峰。DAD 滤光片的使用对于获得尖锐峰形和良好分离度是必要的。原则上，两种滤光片均适用于此应用。然而，为了分离标准溶液 4 中存在的 pd(A) 寡核苷酸，首选 260 nm 滤光片。

测试不同的凝胶

使用 PVA 毛细管和 280 nm 滤光片测试了四种不同的凝胶。首先，比较了三个不同批次的 PEG。对于标准溶液 2，所有峰均实现分离。这对于最后两个峰 (20 mer 和 21mer) 来说尤其具有挑战，因为它们的结构只有 1 mer 的差异。总之，所有三种 PEGs 均适用于寡核苷酸的分离。

为获得更好的分离度，建议使用 20% 乙腈 (ACN)。对于标准溶液 1，使用 ACN 凝胶可获得更好的分离度。然而，对于标准溶液 2 和 3，使用含和不含 ACN 的凝胶，其分离度只有微小的差异。对于标准溶液 4，分离度大幅提升。总之，凝胶中

ACN 的使用取决于样品的种类。对于一些难以实现峰分离的样品，使用 ACN 非常有优势。

测试不同类型的毛细管

测试了三种不同类型的毛细管对寡核苷酸的分离：

- 毛细管 1：PVA，100 μm
- 毛细管 2： $\mu\text{SIL WAX}$ ，100 μm
- 毛细管 3： $\mu\text{SIL DNA}$ ，75 μm

对于所有毛细管类型，总长度为 33 cm，并使用短端检测、280 nm 滤光片和凝胶 1 进行测试。原则上，所有三种毛细管均可用于分离标准溶液 2 中的四种寡核苷酸。所有三个毛细管的峰分离度相似。对于毛细管 1 和 2，实现了更高的信噪比。这是因为这些毛细管具有更大的内径。

总之，优先使用毛细管 1 和 2。然而，毛细管 1 的一个优势在于安装到卡盒中时更易于操作。这是因为可以更安全快速地将检测窗口置于准直接口中，原因是固定塞可确保在检测器中实现正确调整。

迁移时间的重现性

通过使用凝胶 1、280 nm 滤光片和 PVA 以及 $\mu\text{SIL-WAX}$ 毛细管（如图 2 所示）连续六次进样标准溶液 2，对此方法的重现性进行测试。结果获得了良好的 RSD，RSD 低于 1%（表 3）。因此，两种毛细管均可用于可重现分析。对于这两个系列的测量，结果发现，进样 7 至 12 的重现性得到了改善。其原因可能是在此期间毛细管活化更充分。计算最后一个峰 (21 mer) 迁移时间的相对标准偏差 (RSD)。

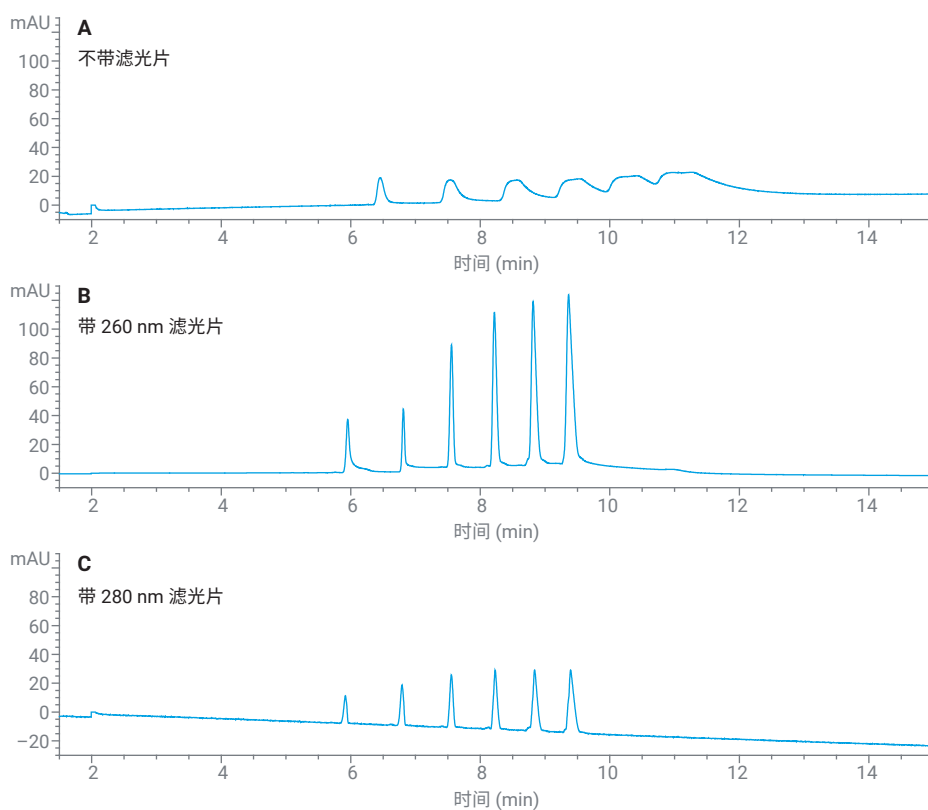


图 1. 标准溶液 1（按 1:2 稀释），短端，凝胶 1，应用不同的 DAD 滤光片

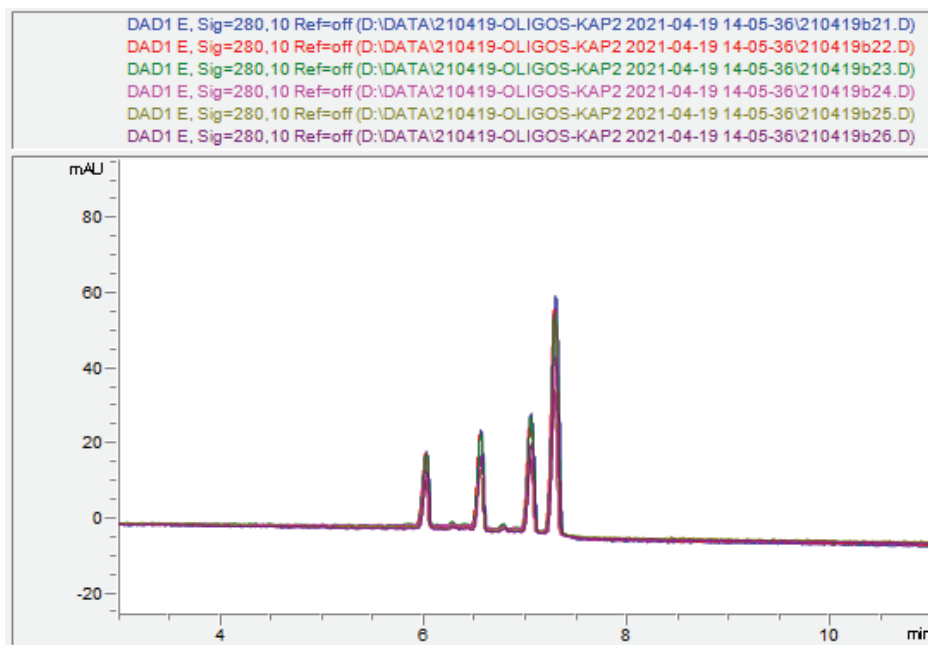


图 2. 使用凝胶 1 和 $\mu\text{SIL-WAX}$ 毛细管对连续进样进行叠加

有效长度

使用 33 cm 毛细管时，可以使用两种不同的分离长度。如果样品在入口瓶的一侧进样，则到检测器的分离长度为 24.5 cm。样品也可以从另一侧（出口瓶的一侧）进样。这一侧更靠近检测点，因此分离长度仅为 8.5 cm（短端检测）。这样，在方法优化过程中，可以使用相同的毛细管轻松测试两种不同的长度。使用凝胶 1、PVA 毛细管和 260 nm 滤光片进行比较测量。图 3 至图 5 显示了标准溶液 1 至 3 的相同电泳图，其中对峰区部分进行了放大。可以观察到，在短端分离中也实现了峰的基线分离。很明显，使用更长的距离可以得到更好的分离度。然而，缺点是分析时间大大延长。对于标准溶液 4，建议使用长边检测，如图 6 中所示。总之，这两种选择都适用于所示样品，无需更换毛细管。优先级可由用户确定。

表 3. 相对标准偏差

测试	毛细管	RSD (%) (进样 1-6)	RSD (%) (进样 7-12)	RSD (%) (进样 1-12)
1	PVA	0.90	0.31	0.67
2	μSIL-WAX	0.51	0.11	0.36

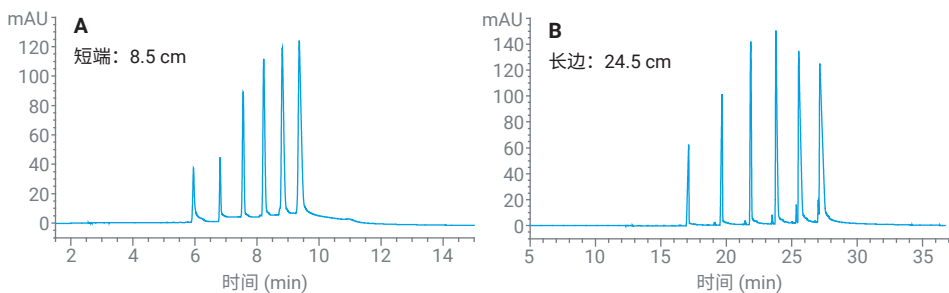


图 3. 使用两种不同的分离长度分离标准溶液 1

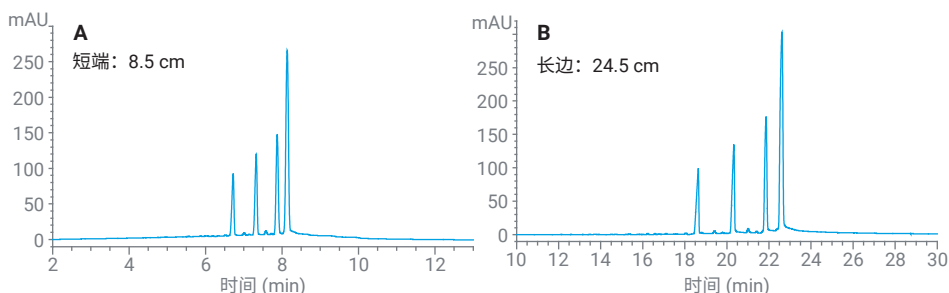


图 4. 使用两种不同的分离长度分离标准溶液 2

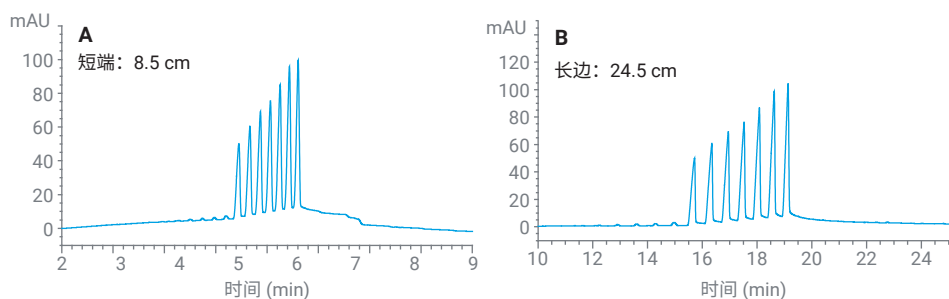


图 5. 使用两种不同的分离长度分离标准溶液 3

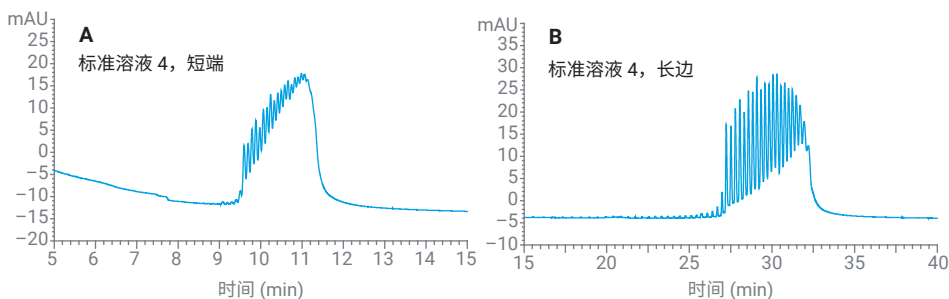


图 6. 使用两种不同的分离长度分离标准溶液 4

温度的影响

改变温度是优化分离的一种简单方法。在 20–35 °C 范围内研究了温度对标准溶液 2 的分离度和迁移时间的影响。图 7 表明，分离度随着温度的降低而增加，图中示出了在每种情况下最后两个峰的分离度。另一方面，由于较低温度下的粘度较高，分析时间也变得 longer。因此，应根据样品的类型和用户的目的是选择最佳温度。

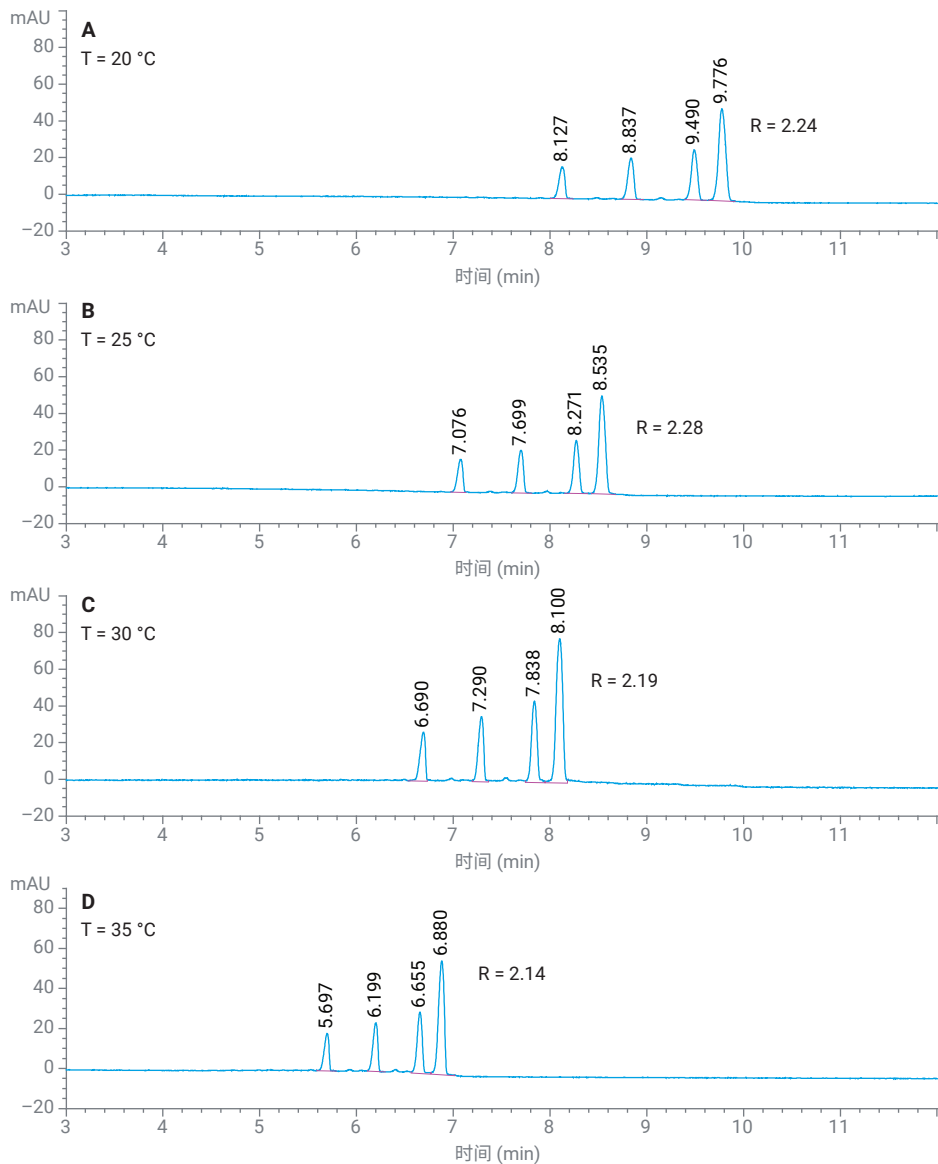


图 7. 温度的影响 (使用凝胶 1、PVA 毛细管和 280 nm 滤光片)

电压的影响

在图 8 中，研究了分离电压对标准溶液 2 的影响。主要关注点在于最后两个峰的分度，分别标记在最后一个峰的右侧。显而易见，电压对分析时间具有巨大影响。此外，可以看出，随着电压的增加，峰形也变得更尖锐，因此由更快的分离引起的分离度损失是适度的。从图 8D 可以明显看出，较高电压与较低温度的组合也是一个关注点。此处，分离速度比 25 kV 快（参见图 8B），但分离度几乎保持不变。综上所述，因此，计划高样品通量的用户可能会对更高的分离电压感兴趣。

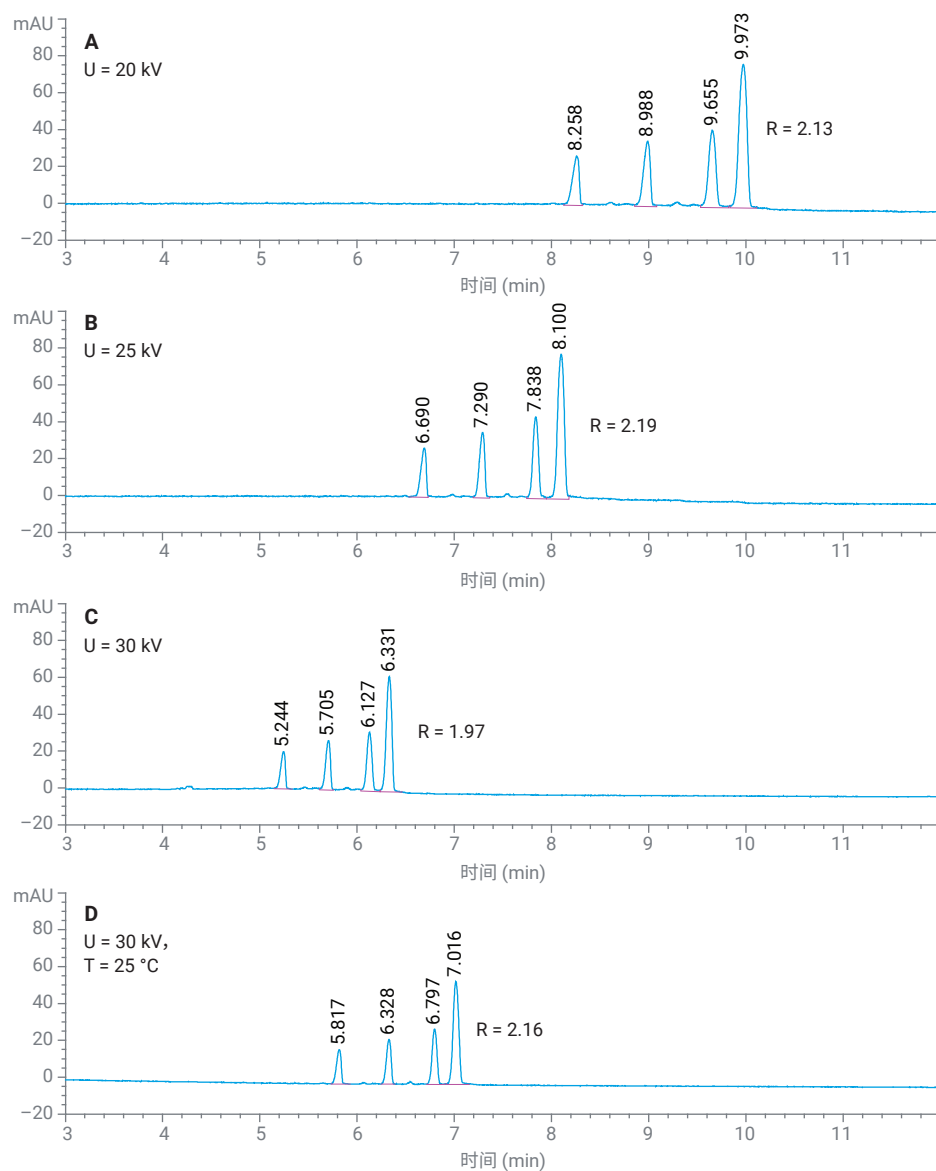


图 8. 电压的影响（使用凝胶 1、PVA 毛细管和 280 nm 滤光片）

对标准溶液 4 分离的优化

分离标准溶液 4 中的寡核苷酸充满挑战，因为涉及到 20 个具有相对较长链（40 mer 到 60 mer）的连续 pd(A) 寡核苷酸。因此，研究了毛细管长度、乙腈添加量和电压优化的影响。对于各实验，应用了 PVA 毛细管和 260 nm 滤光片，并获得了不同条件下的电泳图。图 9 中显示了最佳结果，在每种情况下都调整了图片的缩放比例。通过在凝胶中使用 20% 的乙腈可以大大提升分离度（参见图 9B）。最后，测试了增加 30 kV 的电压，同时将温度降低到 25 °C。从图 9C 中可以明显看出，通过这些更改实现了理想分离。如有必要，还可以进一步优化，例如通过调整样品浓度和进样，或进一步优化乙腈含量。因此，已经证明，可以通过简单快速地调整实验条件来优化复杂的寡核苷酸分离。

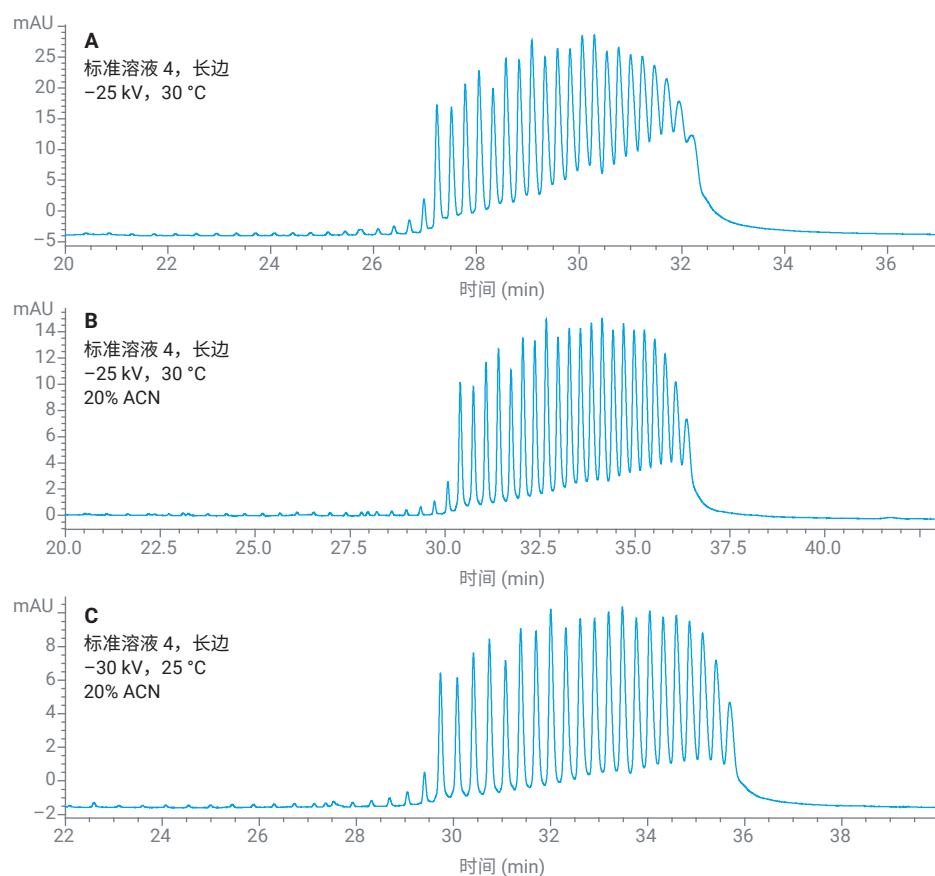


图 9. 标准溶液 4（按 1:2 稀释）的实验条件优化

结论

使用现有的化学品和材料可以良好地重现《使用安捷伦毛细管电泳系统进行寡核苷酸分析》^[1] 中描述的步骤和效果。结果可简要概括如下：

检测能力：原则上，可以在没有滤光片的情况下进行分离。但是，由于峰分离度和重现性较差，不建议这样做。使用 260 nm 或 280 nm 检测器滤光片实现了良好分离。两种滤光片原则上都适用，但使用 260 nm 滤光片可获得更好的信噪比。特别是对于 pd(A) 寡核苷酸，应使用 260 nm 滤光片。

凝胶：测试的所有三种 PEGs 都同样适用于此应用。加入乙腈可以部分提高分离性能。因此，使用当前可购买的化学品，可以成功地进行分离。配制的凝胶至少可使用三周。

毛细管：建议使用 PVA 毛细管和 μ SIL-WAX 毛细管。两种毛细管都获得了出色的分离度和检测强度。PVA 毛细管的优势在于安装到接口时更易于操作。不推荐使用 μ SIL-DNA 毛细管，因为较小的直径会导致检测能力大大降低。

重现性：使用 PVA 毛细管和 μ SIL-WAX 毛细管研究了标准溶液 2 中 21 mer 迁移时间的重现性。对于这两种毛细管，在 12 次进样中均获得了良好的 RSD。该值始终低于 1%。检测峰面积的 RSD 没有意义，因为不同测量之间存在损耗。电动进样可用于验证这一点，因为电动进样只进样带电分析物（而非样品溶液的等分试样）。

优化：在多数情况下，短端检测足以成功快速分离寡核苷酸。对于标准溶液 4，需要进行长边检测。此外，结果表明，本方法可通过使用乙腈凝胶和调节电压与温度，轻松快速地得到优化。

Agilent 7100 毛细管电泳系统适用于广泛的寡核苷酸分析，包括 pd(A)、pd(T) 以及具有混合碱基和不同链长的寡核苷酸。

参考文献

1. Oligonucleotide Analysis with the Agilent Capillary Electrophoresis System (使用安捷伦毛细管电泳系统进行寡核苷酸分析)，安捷伦科技公司应用简报，出版号 5988-4303EN，2001

www.agilent.com

DE44371.9638657407

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2021
2021 年 7 月 27 日，中国出版
5994-3864ZHCN

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

