

## 如需了解更多信息

如需了解更多信息，请访问

[agilent.com/chem/GCMS\\_QTOF](http://www.agilent.com/chem/GCMS_QTOF)

查找当地的安捷伦客户中心：

[www.agilent.com/chem/contactus-cn](http://www.agilent.com/chem/contactus-cn)

安捷伦客户服务中心：

免费专线：800-820-3278

400-820-3278（手机用户）

联系我们：

[LSCA-China\\_800@agilent.com](mailto:LSCA-China_800@agilent.com)

在线询价：

[www.agilent.com/chem/erfq-cn](http://www.agilent.com/chem/erfq-cn)

[www.agilent.com/chem/CE](http://www.agilent.com/chem/CE)

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，2014

2014年5月1日，中国印刷

5991-1660CHCN



**Agilent Technologies**



# 毛细管等电聚焦的原理及应用

基础导论



**Agilent Technologies**

# 毛细管等电聚焦的原理及应用

基础导论

Theresa Kristl, Hanno Stutz, Christian Wenz 和 Gerard Rozing



**Agilent Technologies**

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，2014

2014 年 5 月 1 日，中国印刷

5991-1660CHCN

---

# 目录

前言 — Pier Giorgio Righetti 教授 .....	V
前言 — Wolfgang Thormann 教授 .....	VI
简介 .....	VII
作者介绍 .....	VIII
符号 .....	X
缩写 .....	X
<b>1 电泳 .....</b>	<b>1</b>
1.1 电泳原理 .....	1
1.2 等电聚焦原理 .....	2
<b>2 毛细管等电聚焦 (CIEF) .....</b>	<b>6</b>
2.1 两步法毛细管等电聚焦 .....	6
2.2 一步法毛细管等电聚焦 .....	9
<b>3 CIEF 的实际运用问题 .....</b>	<b>11</b>
3.1 电渗流抑制 .....	11
3.2 两步法 CIEF 检测 .....	11
3.3 pH 梯度的稳定性 .....	13
3.4 占位剂的使用 .....	14
3.5 pI 标记物 .....	15
3.6 聚焦蛋白的沉淀和聚集 .....	16
3.7 不完全聚焦 .....	17
3.8 CIEF 中蛋白样品的离子强度 .....	17
<b>4 CIEF 的应用 .....</b>	<b>18</b>
4.1 推荐方法 .....	19
4.2 试剂、毛细管柱和消耗品 .....	19
4.3 实验 .....	22
4.4 CIEF 方法实例 .....	29
参考文献 .....	33

## 前言 — PIER GIORGIO RIGHETTI 教授



**Pier Giorgio Righetti**

名誉教授，  
米兰理工大学

1960 年，Harry Svensson-Rilbe，这名曾为 Tiselius 默默无闻地工作过的一名谦卑的研究者，发表了自己有关分离蛋白质等两性大分子物质的研究成果，称此类物质能够分离至非等度场，而实施这样的分离需要在电极储液槽之间施加 pH 梯度，这一完全颠覆当时传统观念的电泳实验方案开始撼动乌普萨拉生物化学研究所的研究根基。这一理论在当时理所当然地被认为是纯粹的异端，也并未引起人们的关注。既然等电聚焦理论早在 1960 至 1961 年就已经得到了比较完整的论述，但为什么它在十余年的时间内都没能引起大家的广泛关注？这是由于 Harry 当时只是斯德哥尔摩医院的一名自由科学家，而作为一名资深学者，他手下却只有一名对有机化学并不熟悉的医学专业学生 Olof Vesterberg。因此，虽然相关理论已经得到了明确的阐述，但要应用该理论进行实际操作，尚且缺乏需要大量人力进行研究才能得出的理论支撑以及更加详细的测量参数，也就是说，在迁移途径中使用怎样的 pH 梯度才能确保该梯度在一定的时间内保持稳定？（根据物理学理论，这是不可实现的，因为在已有的报道中，质子在电场中具有最强的流动性）。要成功实现分离，我们所需要的不仅仅是少量能够在分离区域达到稳定状态的两性离子，而是一整队能够在阳极和阴极间如长城般绵延的两性离子。然而令人惊讶的是，Svensson 的这名学生利用休息时间孜孜不倦地自学了大量的有机化学教材，并成功地合成出了在该理论中起关键作用的“载体两性电解质”，这是一种极为无序的合成物质，而作为一名医学专业的学生，要合成出如此无序的物质，几乎是一件不可能的事。无序是否能够产生有序？答案当然是肯定的，如果两性离子的秩序受到强力电场的控制，陡峭的电压梯度会迫使这些两性离子有序地分布，理论上即可使得它们根据各自的等电点 (pI) 值呈（准）高斯分布。一切都在控制之下了吗？这是少数能够抵消熵的技术之一，它尝试通过产生狭窄的聚焦区带来消除向周围介质扩散造成的宽峰，面对如此卓越的技术，无论它的实验支撑有多么单薄，任何人都会认为，是的，成功了，一切都在控制之下！Svensson 和 Vesterberg 也确信自己取得了突破性进展，他们联系了一家斯德哥尔摩的公司 LKB Produkter AB（瑞典布鲁马），希望能生产商业化产品。为确证他们的技术，这两名虔诚的研究者被送往分离科学的圣地乌普萨

拉，去咨询当时电泳界的领军人物 Arne Tiselius。然而，Arne 眼看自己创建的移动边界电泳技术受到如此大的威胁，严厉地斥责了这两人，甚至愤怒地指责他们竟然敢提出一个注定要失败的技术，原因在于大分子离子在逐渐接近其 pI 值的过程中极有可能发生聚集和沉淀。尽管在 Arne Tiselius 处只得到了负面的结果，H. Haglund（他也曾是 Tiselius 的学生）仍然勉强说服了自己的公司 (LKB Produkter AB)，争取到了 60,000 瑞典克朗用于生产载体两性电解质以及一根垂直密度梯度柱用于蛋白的制备纯化。我们的前人为科学所作出的这一切努力就像是昨天才发生的；而时至今日，这一领域已有超过 40,000 篇相关的科学报道，这些出色的作者将 IEF 技术以清晰明了的崭新面貌呈现给读者，同时还将其缩小到了毛细管级别。在此我仅向他们伟大的研究工作致以最衷心的祝贺。

### **Pier Giorgio Righetti**

米兰理工大学名誉教授

更多信息，请查阅 Righetti, P.G., Isoelectric focusing:

Theory, Methodology and Applications, Elsevier, Amsterdam, 1983, 386 pp。

---

## 前言 — WOLFGANG THORMANN 教授



**Wolfgang Thormann**

伯尔尼大学（瑞士伯尔尼）  
教授

等电聚焦是一种高分离度的电泳技术，该技术可在从阳极到阴极逐渐升高的 pH 梯度中分离和分析两性化合物（主要为蛋白质及多肽）。在过去的 30 年中，研究人员为开发毛细管等电聚焦技术付出了极大努力，该技术作为这一分离技术的仪器形式，能够将毛细管或微通道作为聚焦柱，并且将商品化的载体两性电解质作为分离介质。将载体两性电解质加入样品，然后施加电压建立所需的 pH 梯度，从而使得两性分析物根据其等电点的不同得以分离。这种分离既可在静止溶液中进行，也可在流动溶液中进行。在静止溶液中实施毛细管等电聚焦时，需要使用阵列检测器或扫描检测器，或者，在聚焦进行时或聚焦之后都必须使样品移动，这样，当蛋白质通过安装于柱末端的柱上吸光度或荧光检测器时，或当蛋白质被扫入位于柱末端的质谱检测器的离子源时，就能对其进行检测。与此同时，等电聚焦的动态计算机模拟可提供有关基于载体两性电解质进行等电聚焦的基本原理及其复杂性的全面信息，包括两性样品成分的聚焦及分离，pH 梯度的形成、偏移及稳定性，电泳移动，以及缓冲液流速对分析物检测的影响。这些研究成果使我们能够更好地理解等电聚焦的过程，从而进一步开发和改善实验流程。随着涂层毛细管的应用，出现了大量商品化的毛细管等电聚焦实验方案，这些方案应用流动或电泳移动实现转移，并且已成功地应用于单克隆抗体及其他蛋白质的电荷异质性分析，以及蛋白质等电点的测定。

该导论提供了学习毛细管等电聚焦基本原理的一个简单途径，并挑选了一些参考文献帮助读者更深入地了解这种极具吸引力的分析技术。

**Wolfgang Thormann**

伯尔尼大学（瑞士伯尔尼）教授

---

## 简介

在过去的 20-25 年间，等电聚焦 (IEF) 已成为了新一代治疗药物（即生物治疗药物）在研究、开发和生产质量控制过程中不可缺少的生物分析测量方法<sup>1</sup>。近年来，随着原创生物治疗药物的知识产权逐渐被淘汰，以及与此同时非专利生物技术药物（生物仿制药或改进型生物制剂）的出现，该方法在检测生物仿制药与原创生物治疗药物的相似性方面变得尤为重要。

而随着毛细管电泳的出现，IEF 技术也从使用平面胶板发展为使用毛细管。毛细管等电聚焦 (CIEF) 可对重组蛋白质进行自动化、可重复的检测及定量，能够很容易地对分析结果进行记录和存档，因此完全能够满足监管部门的要求。但是，要实际使用毛细管进行 IEF，必须充分了解分析物在电泳过程中的运动，还需要积累大量的实际操作经验。该导论并非旨在针对 IEF 及 CIEF 的基本原理提供全面深入的认识，只是希望能够为有兴趣的读者提供在 Agilent 7100 毛细管电泳系统上使用 CIEF 的入门知识。该导论所述的实验主要基于 Theresa Kristl 在奥地利萨尔兹堡大学完成的硕士论文，该论文在分子生物学系化学及生物分析分部助理教授 Hanno Stutz 博士的指导下完成。

---

## 作者简介

**Theresa Kristl** 曾在奥地利萨尔茨堡大学和林茨大学的一个联合研究项目中进行分子生物学研究。2011年3月，她开始撰写自己的硕士论文，题为“应用毛细管等电聚焦表征蛋白质/过敏原—不同方法策略的优化、验证和比较”，该论文在助理教授 Hanno Stutz 博士的指导下完成，并且是安捷伦科技公司（德国瓦尔德布隆）资助研究项目的一部分。2012年6月，她在奥地利萨尔茨堡大学教授 Christian G. Huber 博士的指导下开始撰写自己的博士论文。她的硕士论文还获得了奥地利化学会 (GOECH) 的嘉奖。

**Hanno Stutz** 现在是奥地利萨尔茨堡大学分子生物学系化学及生物分析分部的助理教授。他在硕士和博士阶段主要进行生物学领域的研究，毕业论文均以分析研究为主题，内容为采用毛细管区带电泳 (CZE) 以及结合固相萃取离线预浓缩的环糊精介导胶束电动色谱 (CD-MEKC) 进行水中农药残留的痕量分析。他在欧盟联合研究中心 (JRC) (比利时赫尔) 的参比物质和测量研究所 (IRMM) 进行了博士后研究，研究重点为应用 CZE-UV、CZE-ESI-MS，以及分析前的毛细管柱中预浓缩技术表征金属结合蛋白。回到萨尔茨堡大学后，他进一步完善了自己的研究领域，开始应用 CIEF、亲和 CIEF 技术，采用毛细管壁涂层技术以防止蛋白吸附，还采用了 CZE-ESI-TOF MS 技术，并实施了方法验证，以及对蛋白质和生物治疗药物进行统计学分析及质量认证。他曾获 1998 年奥地利科学及交通部的荣誉奖、2005 年奥地利化学会 (GOECH) 的科学奖以及 2009 年奥地利分析化学会的 ASAC Feigl 奖。此外，他还是 GOECH 和 ASAC 的委员会成员之一。

**Christian Wenz** 是安捷伦科技公司（德国瓦尔德布隆）的研发科学家。他在德国的汉诺威大学进行生物化学研究，并在德国吉森大学生物化学系 Alfred Pingoud 教授的研究团队中完成了自己的博士论文，论文主题是蛋白质中能够与核酸相互作用的结构和功能。在瑞士癌症临床研究中心 (ISREC)（瑞士埃帕兰日）完成博士后研究后，Christian Wenz 于 2002 年加入了安捷伦科技公司。在过去的十年中，Christian 参与了自动化电泳系统的仪器及应用开发，例如 Agilent 3100 OFFGEL 等电聚焦分级分离仪和 Agilent 2100 生物分析仪。从 2009 年开始，他开始参与开发 Agilent 7100 毛细管电泳系统。安捷伦科技公司发表的多篇有关该仪器的应用简报及技术文献都是由他撰写的。

**Gerard Rozing** 最近刚从安捷伦科技公司（德国瓦尔德布隆）退休。他于 1971 年在阿姆斯特丹大学获得了化学工程及有机化学专业的学士学位，在此之后又于 1977 年初获得了阿姆斯特丹大学的有机化学博士学位，接下来，他在比利时的根特大学作为 NATO 学者进行了博士后研究，直至 1978 年初。此后他来到阿姆斯特丹大学 Hans Poppe 教授的研究团队再次从事博士后研究，研究主题为色谱及分析化学。1979 年，Gerard 加入了德国瓦尔德布隆的惠普公司，成为了一名研发化学家，主要从事固定相开发及 HPLC 系统认证。Gerard 担任研发项目主管一段时间后，成为了研发部经理。2000 年，Gerard 成为了大学关系和外部合作部经理，并一直任职于该职位，直至 2012 年 9 月 1 日退休。2006 年，Gerard 成为了安捷伦科技公司化学分析部的第一研究员。Gerard 是 MSB 战略规划委员会的成员，同时还是《电泳》及《分离科学》杂志的编辑顾问委员会的成员。他现在是布鲁塞尔自由大学和阿姆斯特丹大学的客座科学家。

## 符号

$v_e$	电泳速度
$\mu_e$	电泳淌度

## 缩写词

CE	毛细管电泳
CEC	毛细管电色谱
CGE	毛细管凝胶电泳
CIEF	毛细管等电聚焦
CZE	毛细管区带电泳
2D-GE	二维凝胶电泳
EOF	电渗流
id	内径
IEF	等电聚焦
IPG	固定化 pH 梯度
ITP	等速电泳
MEKC	胶束电动色谱
pI	等电点
SDS-PAGE	十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳

## 1.1 电泳原理

电泳分离是基于不同带电粒子在电场中移动的速度不同。带电粒子为含有强/弱离子化基团或无机离子（例如含有钠离子 ( $\text{Na}^+$ ), 镁离子 ( $\text{Mg}^{2+}$ ) 或锂离子 ( $\text{Li}^+$ )）的分子，这些粒子在电解溶液中实现分离。在电场作用下，带电粒子向与其电荷相反的电极移动。带电粒子移动的速度称为电泳速度  $v_e$ ，主要取决于其质荷比以及电场强度和电解质特性。电场归一化后得到电泳淌度  $\mu_e$ 。

电泳现象于 19 世纪初被发现。Kohlrausch<sup>2</sup> 等人提出了描述电场中离子移动的数学公式并由 Tiselius<sup>3</sup> 等在二十世纪三十年代进行了实际应用。但是，他的移界电泳法并不能分离质荷比相差较小的化合物。高电流产生的对流会导致条带变形。后来人们用固相或凝胶基质代替自由溶液，在平板上进行电泳，从而有效抑制了对流并促使化合物分离为不连续的稳定条带或区域。Tiselius<sup>4</sup> 将该方法命名为“区带电泳”。

由于凝胶基质现成可用（琼脂糖）或很容易制备（聚丙烯酰胺），该方法迅速得到广泛应用。该方法虽然操作繁琐，但成本不高，实验室技术人员很容易掌握。平板电泳有多种模式可获取多肽、蛋白及核酸的分子大小及电荷信息<sup>5</sup>，例如，SDS-PAGE（十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳）可估测蛋白质的分子量。实验室仪器厂商可提供必须的化学试剂和耗材供用户自行开展平板电泳实验。后来出现了各类预制胶，给实际工作带来了便利。脉冲场电泳适合于分离质荷比相似的化合物或高分子量核酸<sup>6</sup>。电泳分离的联用产生了更高分离度的二维凝胶电泳分离方法 (2D-GE)<sup>7</sup>。

Hjertén<sup>8</sup>发现采用毛细管进行电泳能够更加有效的抵消焦耳热带来的弊端，防止产生对流。出于实用性考虑，他选择了直径 3 mm 的管子，并将毛细管绕其轴线旋转以实现毛细管中温度分布的均一性。Mikkers 等人<sup>9</sup>对等速电泳 (ITP) 系统进行了改良，采用 0.2 mm 内径 (id) 的 PTFE 管用于毛细管电泳，这样一来实用性和性能都大为改善。但是，直到 1981 年 Jorgenson 和 Lukacs 才在他们的原创论文中证实了采用窄孔径 (50–75 μm 内径) 熔融石英电泳毛细管中自由溶液电泳分离方法得到超高效率<sup>10</sup>。毛细管区带电泳 (CZE) 成为该技术的通用名称。很快，许多曾经基于平板凝胶电泳的分离模式相继下毛细管电泳平台上得以实现。其中的一些方法衍生自平板凝胶电泳，例如毛细管凝胶电泳 (CGE)。一些新的毛细管电泳法来源于液相色谱，例如胶束电动色谱 (MEKC) 或毛细管凝胶色谱 (CEC)。等速电泳 (ITP) 已经成功地在毛细管电泳平台上进行，并且能够与 CZE 分离模式联用，主要用于样品预富集。

### 1.1.1 电渗流

熔融石英毛细管电泳的一个特点是电渗流 (EOF) 现象。在充满电解液的熔融石英毛细管中，可在毛细管内壁形成双电层。由于石英表面的硅醇基团略带酸性，因此当电解液 pH > 3 时，毛细管内壁带负电。这些电荷可被电解液中其它带有相反电荷的离子中和。由于毛细管的横截面必定为电中性，因此在熔融石英毛细管的内壁附近有少量多余的正离子。在毛细管轴向给电解液施加电场时，这些内壁附近的多余阳离子会带着其水相溶剂化壳移动至带有相反电荷的电极一端。从而使毛细管中的电解质溶液产生流动，即 EOF。其逆过程，也就是电解液在毛细管中的流动所产生的电势，称为流动电位。

## 1.2 等电聚焦原理

上文中提到，电泳分离是基于带电粒子在电场作用下移动的速率不同。当通过分离通道时，分析物离子会根据它们的质荷比形成不同的区带。对流或待分析物与毛细管壁相互作用会产生分子扩散及传质减缓，从而导致区带展宽。

在等电聚焦中，在区带展宽的同时会产生一个反向力，使得带电分析物迁移回它们的区带。该反向力源于待分析物分子及分离基质成分的两性性质。

两性分子同时具有可离子化的酸碱基团，可根据环境的 pH 值带净正电或净负电。在特定 pH 值下，分子中的正电荷和负电荷达到平衡，两性分子变为中性。该 pH 值称为等电点或 pI。蛋白及多肽含有多个可离子化的羧酸及氨基，本质上是两性分子。它们的 pI 取决于其具体的氨基酸组成，同时也取决于其三维结构，即构象，这会影响分子环境继而影响蛋白中单个氨基酸的离子化常数。图 1.1 展现了一个 pI 为 5.5 的模型蛋白的两性特征。

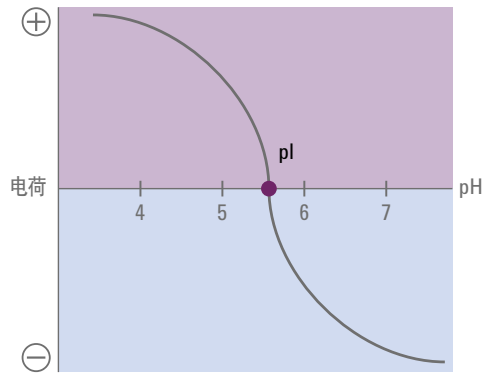


图 1.1 pI 为 5.5 的模型蛋白的两性特征。（取自 Lottspeich, F., Bioanalytik, 2006, 2）

在固定的 pH 环境中，分子所带的净电荷及其迁移速度 ( $v_e$ ) 是固定的单向的。而在变化的 pH 环境中，例如 pH 梯度从低到高，两性分子的电荷发生改变。这就导致其  $v_e$  的大小及方向发生改变。

在典型的 IEF 中，将低 pH 的电解液（阳极液）端的电极被定义为阳极。

另一端的对电极则浸没在高 pH 的电解液（阴极液）中，作为阴极。两个电极之间放置了两性化合物（称为载体两性电解质）的混合物。载体两性电解质为具有不同长度和支链的脂肪族多氨基、多羧基分子。可通过不饱和脂肪酸与聚乙烯胺之间的迈克尔加成反应制得<sup>11</sup>。因此，载体两性电解质本身为两性分子，含有可离子化的酸性和碱性官能团，具有特定的 pI。载体两性电解质的平均分子量约为 200 到 1000<sup>12</sup>。图 1.2 显示了载体两性电解质的典型结构<sup>13</sup>。

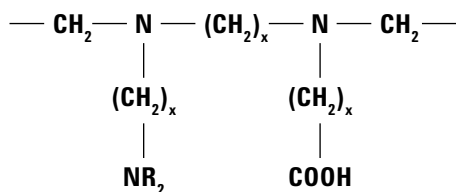


图 1.2 模型载体两性电解质的化学结构<sup>13</sup>

在实际使用中采用覆盖一定 pI 范围的载体两性电解质的混合物。虽然 IEF 可在含有电解质的自由溶液中进行，但在常规使用中会将载体两性电解质与抗对流的聚合物（例如聚丙烯酰胺）进行混合。将该混合物铺在玻璃或塑料的支撑板上，即为通常所称的平板凝胶电泳。

分析开始前，该混合物具有一致的 pH 值，等于所有载体两性电解质的 pI 平均值。施加电场后，产生的电流导致电解质根据其净电荷进行移动。水合氢离子向阴极移动，同时氢氧离子向阳极移动。酸性最强的载体两性电解质向阳极移动的最远，直到其净电荷为零时，停止移动。酸性较弱的电解质较快地被中和，移动距离较短，与酸性较强的电解质邻近。在另一端，碱性最强的电解质向阴极移动的距离最远直到其被中和。因此，pH 梯度中，阳极一端 pH 值最低，阴极一端 pH 值最高。

凝胶板制备完成后，将含有未知蛋白的样品和含有已知 pI 蛋白的样品（称为 pI 标记物）加入平板中间的小孔，然后施加电场。蛋白根据自身电荷开始移动，然后在环境 pH 值达到自身 pI 的位置发生中和。电流稳定后，将电场关闭。使用着色剂或染色剂来显示区域。

有些情况下还需加入添加剂以提高蛋白溶解性（在蛋白 pI 时，其溶解性最小，而聚焦会使得蛋白在该区域浓度最高）或避免蛋白聚集<sup>14</sup>。

虽然该方法已被证实适用范围广泛，但需耗费大量的人力和时间。此外，还需要使用毒性化学试剂，并且对操作人员的实验经验有较高要求。该方法的重现性较低，容易出现阴极偏移（在阴极端的高 pH 环境下会有蛋白丢失），且不能用于定量。但是，可在 pH 梯度中通过比较未知蛋白的位置与已知 pI 标记物的位置来获取 pI 的准确信息。不过与其它蛋白表征方法联用后，该用途也就显得毫无意义了。

Bjellqvist 等人提出的固定化 pH 梯度 (IPG) 凝胶带来了显著的改善<sup>15</sup>。在这种情况下，载体两性电解质分子与基质共价连接作为抗对流介质。载体两性电解质（在这种情况下称为固定化电解质）含有一个可聚合的乙烯基团，使得载体两性电解质与聚丙烯酰胺基质实现交联。采用不同 pI 的固定化电解质以获得 pH 梯度。

使用固定化 pH 梯度能够有效避免上文中提到的许多与载体两性电解质产生的 pH 梯度有关的操作缺点。IPG 常以聚酯片状再水化凝胶（通常为 25 x 11 厘米）形式提供。放置凝胶和提供电场的装置可从 GE Healthcare 公司和其它多个厂商获得。该仪器还可对凝胶板进行冷却以帮助上样。IPG 凝胶非常适用于 2D-GE，而 IPG 条带（5–10mm 宽）常用于第一维<sup>16</sup>。

在 Agilent 3100 OFFGEL 等电聚焦分级分离仪，蛋白或多肽混合物在 IPG 条带中根据各自的 pI 进行分离，同时可从溶液中进行回收。Invitrogen 公司和 Protein Simple 公司也提供其它使用平板凝胶 IEF 的系统用于蛋白和多肽制备。

尽管如此，IPG-IEF 仍然需要大量手动处理，难以实现自动化，定量结果不够准确，并且很难进行电子归档。

除了平板表面，凝胶 IEF 还可在管中进行。目前正在使用的有较大直径的 PTFE 或玻璃毛细管（0.5–2 mm 内径）<sup>17</sup>。然而，由于仍需要制备分离基质，在管中进行 IEF 与平板凝胶 IEF 一样，仍然需要大量手动处理。而且只能使用低电压，才能将凝胶中的温度梯度降至最低程度。除了低电压外，还需要额外的冷却步骤，并且需要过夜分离。

Hjertén 和 Zhu<sup>18</sup> 最先认识到极窄内径的毛细管（例如毛细管电泳中所使用的）可能更适用于消散电流产生的热量，这样便能使用更高的电场来加速分离。他们在实验中使用了内径 0.2 mm 的玻璃毛细管。熔融石英毛细管实际上已成为 CZE 的标准配置，同时内径为 50  $\mu\text{m}$  和 75  $\mu\text{m}$  的熔融石英毛细管也专门用于 CIEF。尽管 IEF 可在无支持基质的毛细管或扁平管中进行，但实际操作中仍常用凝胶来辅助抑制电渗流以及减少扩散。

现在，CIEF 可在毛细管电泳标准仪器中执行，例如 Agilent 7100 毛细管电泳系统。在市售的毛细管电泳仪器中，CIEF 只是多种电泳分离法的其中一种操作模式。Agilent 7100 CE 系统采用熔融石英毛细管，具有了低 pH 和高 pH 电极（即阳极和阴极），可施加电场、固定 pH 梯度，还可进行紫外-可见光检测，并能实现自动化。除非另外说明，以下内容中均使用 Agilent 7100 CE 系统进行实验。

## 2.1 两步法毛细管等电聚焦

采用毛细管进行 CIEF 有多种重要意义。与平板凝胶 IEF 或 IPG 凝胶电泳不同，在 CIEF 中，可先将蛋白样品、标准品（即 pI 标记物）、载体两性电解质、聚合物以及可选的添加剂进行预混合，然后注满熔融石英毛细管，如图 2.1 所示。



图 2.1 一种载体两性电解质和样品蛋白的混合物填充在分离毛细管中。灰色表示预混合。

将进样后的毛细管一端与低 pH 电极（阳极）相连，另一端与高 pH 电极（阴极）相连，然后施加电场（如图 2.2）。阳极瓶中的水合氢离子会向阴极一端移动，同时阴极瓶中的氢氧离子会向阳极一端移动。在该过程中，蛋白和两性电解质在毛细管中按 pI 从低到高实现分离。

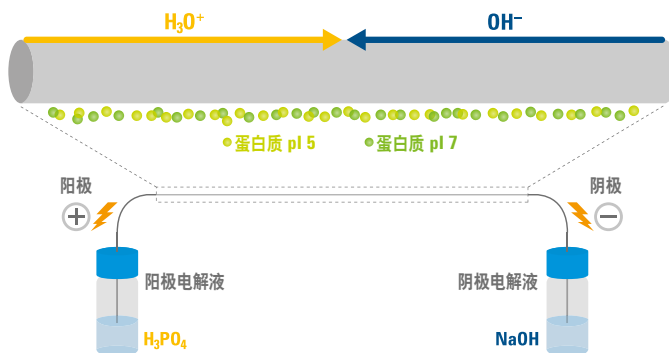


图 2.2 施加电场后，利用阳极液（稀释的磷酸）和阴极液（稀释的氢氧化钠溶液）中  $\text{OH}^-$  及  $\text{H}_3\text{O}^+$  离子的迁移产生初始 pH 梯度的流程图

需要注意的是，图 2.2、图 2.3 和图 2.4 中描述的过程是同时发生的而不是连续发生。

在聚焦开始时可观察到很高的电流，然后在几分钟内不断降低直到最小。电流的这一变化趋势是由于 pH 梯度的形成。分析物和载体两性电解质初始都带有一定的净电荷，在聚焦过程中与  $\text{H}_3\text{O}^+$  和  $\text{OH}^-$  作用，该净电荷不断下降直至中和。初始电流由  $\text{OH}^-$  和  $\text{H}_3\text{O}^+$  及其反离子产生，例如，钠离子和磷酸根离子、带电载体两性电解质（形成自然 pH 梯度时）以及分析物。聚焦过程完成后，电流变得非常低（基本是初始电流值的 10%），这是因为分析物和载体两性电解质丢失了它们的净电荷。达到平衡后，载体两性电解质和两性样品分子（蛋白、多肽）按 pH 值从低到高排布（如图 2.3 和图 2.4）。

为了进行检测，分析物必须通过检测窗口。迁移过程紧接着聚焦步骤进行，下面进行具体阐述。由于迁移是一个独立的步骤，因此方法被称为两步法 CIEF。



图 2.3 利用载体两性电解质产生并稳定 pH 梯度。聚焦步骤中 pH 梯度的产生和分析物的聚焦是同时发生的，只是这里分开描述



图 2.4 在聚焦步骤中，pI 5 和 7 的模型蛋白从毛细管的两侧分别接近他们的聚焦区带。最终，pI 5 和 7 的两种蛋白分别聚焦在  $\text{pH} = \text{pI}$  区域的一个很窄的条带里。

## 2.2 一步法毛细管等电聚焦

在一步法 CIEF 中，蛋白和两性电解质的聚焦在熔融石英毛细管中存在残余电渗流的条件下进行<sup>19,20</sup>。在这种情况下，蛋白区域实现聚焦且在 EOF 作用下向检测窗口迁移。如果 EOF 速率低于聚焦区域的速率，整条蛋白带可在到达检测器末端前实现平衡<sup>21,22</sup>。

实际运用中，先用阴极液充满整根毛细管。蛋白样品及载体两性电解质混合后从毛细管的一端入口（阳极）引入。区域长度是毛细管有效长度（至检测窗口）的 10% - 15%。施加电场后，以下两个过程同时发生：

- A. 纵向 pH 梯度形成，样品中的蛋白同时分离及聚焦
- B. 低 EOF 存在下，所聚焦蛋白及两性电解质的整个区域向阴极移动并通过检测窗口。碱性蛋白先于中性和酸性化合物到达检测器

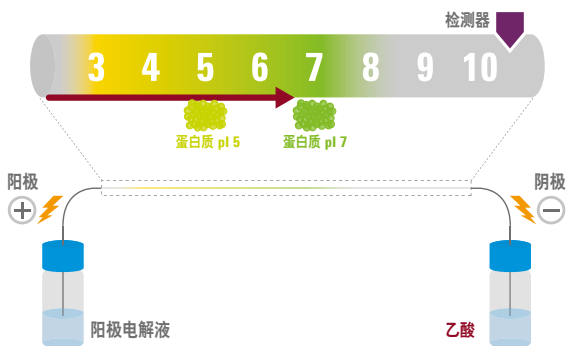


图 2.5 一步法 CIEF 过程图 (经允许根据参考文献 22 有所改动)

尽管通常认为一步法 CIEF 是一个简单的方法，但实际应用中并非如此。特别是剩余 EOF 需要与载体两性电解质或分析物区域的速度达到平衡，以确保聚焦蛋白到达检测窗口之前实现蛋白的完全聚焦。如果不能确保这一点，可能会出现诸如双重或多重峰的现象。因此，仍需使用带涂层的毛细管。或者可以加入亲水聚合物，比如羟乙基纤维素，用以将熔融石英毛细管的内壁去活。

未涂覆的熔融石英毛细管已用于一步法 CIEF。为了使得碱性蛋白在高  $pI$  时达到平衡，需要加入一种强碱，例如四甲基乙二胺 (TEMED)，其可在阴极最先分离，早于大多数碱性分析物或两性电解质区域。Schwer 已对该方法进行重点综述<sup>23</sup>。本基础导论主要讨论两步法 CIEF。

## 3.1 电渗流抑制

在两步法等电聚焦过程中，也就是平衡过程中，很明显，如果存在液流 (EOF)，那么蛋白可能无法在通过检测窗口之前完成依据自身 pI 值的完全分离。有很多方法可以抑制 EOF。将中性高分子量聚合物，例如羟丙基甲基纤维素<sup>24</sup> 或聚丙烯酰胺加入载体两性电解质或样品混合物和分离电解质中可抑制 EOF，这些聚合物会粘附在熔融石英毛细管的表面，增加分离介质的粘度，从而降低分子扩散导致的聚焦区域增宽。在毛细管内壁涂覆永久性线性聚丙烯酰胺已经被证明是非常有效的方法，此类毛细管已经投入市场。不过，由于该涂层需要暴露于极高和极低的 pH 环境下，因此人们对涂层的稳定性存在一定的顾虑。而如今，毛细管涂层在很大程度上不再受到这些条件的限制（参见第 4 章“CIEF 的应用”）。

## 3.2 两步法 CIEF 检测

CE 仪器的检测窗口位于分离毛细管的出口端。一旦蛋白或多肽混合物在 CIEF 过程中依据 pI 得到分离，单个的分析物区域在毛细管中按由低到高的 pI 进行分布，最好是在达到检测窗口之前完成分离。因此，分析物区域需要移动至毛细管出口以通过检测窗口。为此建立了两种较为适宜的方法：压力迁移和化学迁移。

在压力迁移中，在入口端的阳极液瓶中施加少量气压<sup>15</sup>。这时，熔融石英毛细管的分析物被推动向前，每个区带都将被推往检测窗口，继而被推出毛细管的出口。在这个过程中，持续施加电场以减少区带展宽。然而，由于毛细管中存在压力推动流，可能会出现一些分析物聚焦区带展宽的现象。

在化学迁移中，阳极液或阴极液被替代为另一种具有高离子强度或不同 pH 值的电解液。例如，在阴极端使用氯化钠，氯离子可迁移到毛细管，取代氢氧根离子并破坏 pH 梯度<sup>25</sup>。样品分析物和载体两性电解质获得净电荷，因此它们会向着出口移动以通过检测窗口。

或者，可采用弱酸性溶液代替阴极液（见图 3.1）。化学迁移液（醋酸）中的醋酸根离子从阴极侧进入毛细管，同时阳极液（ $\text{H}_3\text{PO}_4$ ）中的水合氢离子由阳极侧进入毛细管。pH 梯度被乙酸和载体两性电解质破坏，分析物可获得净的正电荷，从而向阴极液移动，也就是检测窗口所在的一侧。采用乙酸的化学迁移原理如图 3.1 所示。值得注意的是， $\text{pI} < 4$  的蛋白在乙酸环境下不能移动。对于酸性更强的蛋白，需要在阴极液中使用更强的酸。



图 3.1 采用乙酸作为化学迁移剂的化学迁移原理。pH 梯度被乙酸破坏，分析物获取正电荷，向检测器移动

说到这里，有必要提及在 CIEF 仪器上的一个改进。Wu 和 Pawlyszin<sup>26</sup> 发明了“全毛细管图像检测”方法，采用 CCD 摄像头检测整个分离毛细管，因此无需将待分析物移动至检测窗口。该技术已由 Convergent Biosciences 公司（如今并入 ProteinSimple 公司，位于美国加州圣克拉拉市）生产并出售，产品名为 iCE280<sup>27</sup>。该方法被称为成像-CIEF，与上文描述的传统 CIEF 相区别。

本基础导论主要介绍标准 CE 系统，例如 Agilent 7100 毛细管电泳系统的 CIEF。作为标准系统，Agilent 7100 CE 系统是一个多方法、多功能的系统，可以实现多种毛细管电泳分离模式<sup>28</sup>。而 ProteinSimple iCE280 是一种专用仪器，仅适用于 CIEF 方法。潜在用户必须要深思熟虑决定选择哪种系统：是传统的 CIEF 还是成像 CIEF。

本文将在下一章节中解释进行传统 CIEF 实验的细节。所描述的现象一定程度上只会发生在 CIEF 中。

### 3.3 pH 梯度的稳定性

要实现可重复、可重现的 CIEF 分离，主要的先决条件就是 pH 梯度的稳定性。下面的实验因素均会影响梯度稳定性：

- 阳极液和阴极液的浓度
- 载体两性电解质
- 阳极和阴极偏移

由于在阳极液和阴极液储瓶中会发生电解，电解液的导电性和 pH 值可能会随时间发生变化<sup>29</sup>。在低 pH 电解质中使用较高浓度的磷酸，在高 pH 电解质中使用氢氧化钠，可有效抵消这种影响。或者也可以在 2 到 5 次分析后更换瓶中的电解液。

市面上有多种具有不同化学结构和离子化基团的载体两性电解质产品，例如 Ampholine、Pharmalyte（这两个均出自 Amersham Pharmacia Biotech 公司，位于瑞典乌普萨拉），Servalyte（Fluka 公司，位于瑞士布赫斯），以及 Bio-Lyte（BioRad 公司，位于美国海克力斯）。这些产品可覆盖特定的 pH 范围，由多种不同数量和类型的异构体组成<sup>30,31</sup>。实际应用中，用户可能想要混合不同 pH 范围的产品，以便在特定的 pH 范围获得更高的分离度。Salzburg 团队选择了最适于他们实验的 Pharmalyte 产品，并实现了其他研究人员所获得的结果<sup>30,31</sup>。

另一个现象是分离毛细管中载体两性电解质的丢失，也称作阳极和阴极偏移。事实上这是由另一个称作等速电泳的电泳效应导致的，其中阴极液中的阳离子使得带正电的两性电解质移动出毛细管的阴极侧。该效应可通过使用更高浓度的阴极液来抵消。不过最近更常用的方法是在样品混合物中添加名为占位剂的试剂来实现<sup>32</sup>。

### 3.4 占位剂的使用

如上文所述，酸性和碱性的载体两性电解质可能会分别扩散到阳极液瓶和阴极液瓶中，这会降低极酸和极碱性分析物的分离度，因为其各自聚焦区域的 pH 梯度范围被缩小了。此外，由于整根毛细管充满了载体两性电解质和样品溶液，因此聚焦在检测器到毛细管出口端的蛋白质在迁移过程中无法被检测到。

需要在样品中加入一种特殊的电解质，用于占据阴极端到检测器之间的毛细管。这样一来，就不会发生蛋白聚焦在检测窗口之后的现象了。为了避免酸性两性电解质的扩散，在阳极端同样需要加入类似的占位剂。加入这些电解质后，用于形成 pH 梯度的毛细管长度缩短了，因此 pH 梯度被压缩了。这可能会导致分离度的降低<sup>14</sup>。这些电解质被称为占位剂，在分析之前加入样品。

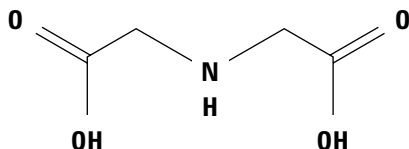


图 3.2 亚氨基二乙酸阳极占位剂的化学结构

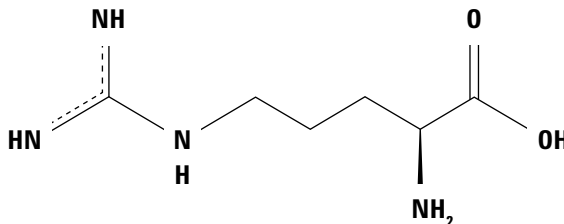


图 3.3 精氨酸阴极占位剂的化学结构

阳极占位剂为 pI 值大于阳极液的 pH 值、但低于 pH 3 的分子，pH 3 通常被视为宽 pH 范围的载体两性电解质中最酸的载体两性电解质的 pI 值。相应的，阴极占位剂分子的 pI 值应低于阴极液的 pH 值但仍大于 pH 10，pH 10 被视为宽 pH 范围的载体两性电解质中碱性最大的载体两性电解质的 pI 值。

占位剂本身还需是良好的载体两性电解质，使其处于 pH 梯度的两端，从而可有效地阻止物质的扩散。pI 值为 2.2 的亚氨基二乙酸、pI 值为 10.7 的 L-精氨酸能满足这些要求，同时是不错的载体两性电解质。这两种化合物均已成功作为占位剂使用<sup>33</sup>。亚氨基二乙酸和 L-精氨酸的化学结构如图 3.2 和图 3.3 所示。阳极和阴极占位剂作为可牺牲的两性电解质，保护载体两性电解质不会离开毛细管。阳极和阴极占位剂的位置如图 3.4 所示。可根据需要调节占位剂的浓度，应对不同的分离挑战。阴极和阳极占位剂的浓度过高会压缩 pH 梯度，从而导致分离度降低。而如果所使用的占位剂浓度太低，会导致 CIEF 的 pH 梯度扩展，虽然有利于分离，但也会发生载体两性电解质丢失的情况。实际应用中，低浓度的阴极占位剂还会影响对检测窗口之后发生聚焦的碱性蛋白的检测。因此，需要尝试不同的占位剂组合和浓度以获得最佳的分离度、pH 梯度的暂时性稳定以及所有相关化合物的检测。



图 3.4 聚焦步骤中建立 pH 梯度后，阳极和阴极占位剂在分离毛细管中的位置

### 3.5 pI 标记物

采用 CIEF 进行蛋白聚焦后，特定区域 pI 值的测定仍是一个关键步骤<sup>34</sup>。尽管可以认为 pH 梯度是线性的，但如果不进行参比或校正，pI 的测定结果也是不准确的。通常在样品中加入 pI 标记物（也可以独立分析，或在平板凝胶 IEF 的平行通道中同时分析），通过插入法来确定未知蛋白的 pI 值。为了降低插入误差，这些参比化合物或 pI 标记物应该尽可能地与靶标蛋白接近。

如今优选多肽作为 pI 标记物，多肽分子结构均一旦稳定性高。通过改变多肽中氨基酸的类型和数目可覆盖不同的 pI 范围。表 3.1 中列出了常用的 pI 标记物示例。

多肽	pI 值
Trp-Tyr-Lys-Lys	9.99
Trp-Tyr-Tyr-Lys-Lys	9.50
Trp-Glu-His-Arg	7.00
Trp-Glu-His	5.52
Trp-Asp-Asp-Arg	4.05

表 3.1 多肽 pI 标记物产品（出自 AB SCIEX 公司）列表，pI 范围从 4.1 到 10.0。序列参考了 Shimura 等人<sup>35</sup> 为 CIEF 的 pI 校正所提出的合成多肽。

### 3.6 聚焦蛋白的沉淀和聚集

由于聚焦在一个较窄的区带，每种蛋白的局部浓度增加。同时，蛋白电荷被中和。结果导致蛋白的溶解性降低。聚焦区域可能会发生蛋白沉淀或聚集。沉淀显示为极窄的峰或尖峰，在分析过程中随机出现。沉淀或聚集的形成会影响实际的聚焦过程。如果蛋白聚集物或沉淀不能从毛细管中冲出，它们有可能会堵塞毛细管。并且，蛋白聚集或沉淀可能会导致电流不稳并最终降至零。

可在样品混合物中加入添加剂来提高蛋白的溶解度，特别是在等电点时的溶解度，从而避免蛋白沉淀。已经测试过多种不同的助溶剂，例如甘油、乙二醇、两性离子和中性去垢剂。尿素也是 IEF 中常用的一种助溶剂<sup>36</sup>。尿素溶液需要新鲜配制，因为尿素容易降解为氨和异氰酸酯<sup>37</sup>，这会导致 N 端和  $\epsilon$ -氨基的氨甲酰化，改变蛋白的净电荷从而产生结构异质性<sup>38</sup>。

### 3.7 不完全聚焦

需要注意，所有分析物需要在通过检测器之前完全聚焦。由于分析物从毛细管两端向它们各自的聚焦区域迁移，如果聚焦不完全，可能导致一种分析物产生两个信号。继而会被错误地认为是共存异构体或杂质<sup>39</sup>。通过分析物聚焦过程中电流的变化可初步判断是否聚焦完全。当电流最小时，至少载体两性电解质已到达它们的最终位置。如果还有疑虑，可延长聚焦时间，然后比较峰图是一致（聚焦完全）还是有差异（表示延长前聚焦不完全）。不过需要注意，延长聚焦时间会提高近乎零净电荷的蛋白在高浓度区域内的接触，从而导致蛋白在毛细管中聚集或沉淀的可能性增加。此外，CIEF 中的头对头迁移可能还会导致在迁移步骤之前就有峰出现。这与分析物从毛细管的远端，也就是检测器之后迁移至它们的聚焦区域有关<sup>32</sup>。

### 3.8 CIEF 中蛋白样品的 离子强度

低离子强度的蛋白样品更适于采用 CIEF 方法。蛋白样品溶解于高浓度电解质和缓冲液中会导致聚焦开始时即出现峰电流，这可能会损坏涂层毛细管，且由于焦耳加热引起毛细管内温度增加会导致蛋白变性。对于生物样品，建议在 CIEF 前进行脱盐。但是，在某些情况下，低含量的盐与纯水相比可以提供更高的分辨率<sup>40</sup>。

如前所述，通过等电聚焦进行化合物分离的首要条件是这些化合物具有两性特质。这些化合物具有质子化基团可发生脱质子，例如氨基，反之亦然，例如羧酸根基团。因此，CIEF 分离的主要对象是蛋白和多肽。此外，一些小分子也可能为两性，可采用 CIEF 进行  $pI$  及  $pK_a$  测定<sup>41</sup>。

随着 IEF 中毛细管的引入，以及毛细管电泳仪器中 CIEF 的实现，CIEF 成为八十年代晚期和九十年代早期开发和生产重组蛋白中的一项重要分析技术。CIEF 的主要目的直到如今依然是测定纯化后重组蛋白的  $pI$  值以及评价特定蛋白的电荷异质性。

这种异质性是细胞机器产生重组蛋白的结果。也可能是结构降解的结果。这就很容易理解一些因果关系，比如蛋白中残留的天冬酰胺和谷氨酸的脱酰胺基化是如何改变特定蛋白的  $pI$  值的。由于分子中存在多个离子化基团，这会使其变成不同的分子。对于大分子量的蛋白，例如含多个天冬酰胺或谷氨酸的生物治疗药物，翻译后修饰导致的结构变化数目可能会大大增加。

同时，很多用于治疗的第一代重组蛋白，专利保护已到期或是很快便到期。诸如促红细胞生成素 (EPO) 等蛋白的高性价比复制品（即生物仿制药）已经开始进入制药市场。不过生物仿制药与原创药一样，仍表现出相同的大分子复杂性。它们可能是通过其他生物途径制得，因此对生产过程中的翻译后修饰依然十分敏感。当将重组蛋白或生物仿制药用于并非原本设计的用途时，例如兴奋剂，法医学实验室必须具有将其检测出的能力。

单克隆抗体是一类特殊的蛋白，常用于癌症治疗。不同于重组蛋白，单克隆抗体通过另外一种生物途径制备，但具有相同的复杂性。单克隆抗体的分子量约为 150000。由于它们的生物学功能，它们表现出大量的结构多样性，特别是与糖基化相关的结构。显然这些分子可能会在生产中发生翻译后修饰，在储存中发生降解，这会影响到它们用于治疗时的有效性和安全性。现在，大约 40%–50% 的生物治疗药物为单克隆抗体<sup>42</sup>。

特别是在蛋白组学中，未知蛋白的 pI 值极其重要，是其通过数据库（例如 ExPASy 或 SwissProt）进行鉴定的重要参数。多肽的结构图信息再结合 pI 值，大大有助于未知蛋白的鉴定。

与平板凝胶等电聚焦不同的是，其 pH 范围的校正是通过测量每种蛋白或多肽的迁移距离进行的，在 CIEF 中，需要使用 pI 标记物进行校正以获得未知蛋白或多肽的 pI 值。Righetti 撰写了一篇出色的有关 pI 值测定的综述<sup>34, 43</sup>。该作者明确指出了采用 CIEF 进行 pI 测定的优势和劣势。特别是对于 pH 梯度的线性假定需要谨慎对待。在临床分析中，CIEF 已成为血红蛋白电荷异构体的测定方法，该异构体用于指示糖尿病的严重程度<sup>44</sup>。

## 4.1 推荐方法

以下章节提供了 CIEF 的实验指南，并概述了一些用于测定仅知道大概 pI 值或 pI 值未知的蛋白质的模型方法。这些方法虽然不能保证对读者的每个目标样品都能实现最佳的分离度，不过可作为 CIEF 方法优化的起始点。根据实际样品组成和分析物浓度，用户需要考虑如下几个方面：

- 样品组成的变化
- 载体两性电解质的组成和浓度
- 混合使用宽、窄 pH 范围的载体两性电解质
- 改变毛细管长度
- 占位剂浓度
- 聚焦时间

## 4.2 试剂、毛细管柱和消耗品

本章中列出的设备和化学试剂可在表 4.1 中列出的厂家购买到。如需获取具体的订购信息，请查看相关网站。表 4.2 列出了安捷伦消耗品的订购信息。表 4.3 列出了非安捷伦消耗品的供应商和产品信息。

供应商	网站
安捷伦科技有限公司, 美国加利福尼亚州圣克拉拉市	www.agilent.com
艾普利公司, 德国达姆施塔特	www.applichem.com
AB SCIEX 公司, 美国马萨诸塞州弗雷明汉	www.absciex.com
GE 医疗, 美国威斯康星州沃基肖	www.gehealthcare.com
默克医药公司, 德国达姆施塔特	www.merck.com
Metabion 国际公司, 德国马丁斯雷德	www.metabion.com
Sigma Aldrich 公司, 美国密苏里州圣路易斯	www.sigmaaldrich.com

#### 4.1 试剂、毛细管和消耗品厂商的网址

组分	安捷伦订单号
用于 50 $\mu\text{m}$ 内径标准毛细管柱的准接口 (颜色标记: 绿色)	G1600-60210
$\mu\text{SIL-FC}$ 毛细管柱 (涂覆有 0.075 mm 厚的氟碳聚合物膜)	194-8111
大鼠抗 DYKDDDDK 单克隆抗体	200477-21
260 nm 带通检测器滤光片	G7100-62700
280 nm 高通检测器滤光片	G7100-68750
钳口/卡口样品瓶, 聚丙烯 (1 mL)	5182-0567
卡口瓶盖, 聚氨酯	5181-1512
样品瓶, 聚丙烯 (100 $\mu\text{L}$ )	9301-0978

表 4.2 安捷伦试剂、毛细管和消耗品的订购详情

组分	供应商	订单号
氢氧化钠溶液 (NaOH) 1.000 mol/L	艾普力	011002006
CIEF 毛细管: 中性涂层毛细管	AB SCIEX	477441
CIEF 凝胶	AB SCIEX	477497
3 种 pI 标记物 (7.0、5.5、4.1), 来自 CIEF 多肽标记物试剂盒	AB SCIEX	A58481
核糖核酸酶 A (RnA) (pI 9.68) 和碳酸酐酶 II (CA II) (pI 5.91), 来自 Beckman CIEF 试剂盒	AB SCIEX	477490
Pharmalyte, pH 3-10 (PL 3-10), 用于 IEF, 0.36 meq/mL pH	GE 医疗	17045601
Pharmalyte, pH 5-6 (PL 5-6), 用于 IEF, 0.36 meq/mL pH	GE 医疗	17056401
Pharmalyte, pH 5-8 (PL 5-8), 用于 IEF, 0.36 meq/mL pH	GE 医疗	17045301
磷酸 ( $H_3PO_4$ ): 含量不低于 85 %	默克	K42661473
乙酸, 100 %	默克	1000632500
合成多肽 1 (SP 1, pI 4.72), 纯度 > 95 %	Metabion	按需合成
合成多肽 2 (SP 2, pI 4.51), 纯度 > 95 %	Metabion	定制合成
甲基纤维素, 粘度 1,500 cP, 2 % 水溶液 (20 °C)	Sigma Aldrich	M0387
尿素, 纯度 ≥98 %	Sigma Aldrich	U6504
L-精氨酸: $C_6H_{14}N_4O_2$ , ≥99.5 % (NT)	Sigma Aldrich	100930559
亚氨基乙酸: $C_4H_7NO_4$ : 98 %	Sigma Aldrich	2055554
白蛋白, 来自鸡蛋清 (卵清白蛋白): 冻干粉 ≥ 98 %	Sigma Aldrich	1000946409
肌红蛋白, 来自马心脏, 含量不低于 90 % (PhastGel)	Sigma Aldrich	3097050
荧光 IEF 标记物, pI 7.2	Sigma Aldrich	89951
荧光 IEF 标记物, pI 7.6	Sigma Aldrich	89952
碳酸酐酶 II (CA II), pI 5.4	Sigma Aldrich	2325766

表 4.3 非安捷伦试剂、毛细管和消耗品的订购详情

以下项目需由用户自己提供：

- 实验室超纯水系统，用于提供超纯（I类）水
- 分析天平
- 实验室天平
- 刮片
- 配有微量吸液头的移液器，1–10  $\mu\text{L}$ ，10–100  $\mu\text{L}$ ，100–1000  $\mu\text{L}$
- 涡旋仪
- 容量瓶
- 离心机
- 安全锁定试管，1.5 mL，500  $\mu\text{L}$

## 4.3 实验

### 4.3.1 将毛细管柱 装入 CE 卡盒

AB SCIEX 中性涂层毛细管或 Agilent  $\mu\text{SIL-FC}$  毛细管，均为 50  $\mu\text{m}$  内径，可用于 CIEF 测量。

1. 安装前将毛细管切成适当长度。在后续的方法实例中，毛细管总长为 32–33 cm
2. 插入毛细管，并将其与准直接口对齐。对着光或使用放大镜检查预烧制毛细管窗口是否对齐
3. 将准直接口插入卡盒，然后关闭卡盒
4. 将卡盒安装在 Agilent 7100 CE 系统之前，首先确保已插入检测器滤光片。使用 260 nm 带通滤光片 (G7100-6200) 或最新的 280 nm 高通滤光片 (G7100-68750)

### 4.3.2 处理和储存毛细管

根据厂商的要求处理 AB SCIEX 中性涂层毛细管。避免毛细管过分干燥。如果几小时或整夜不用，需将毛细管储存于 4–8  $^{\circ}\text{C}$  的冰箱，且毛细管两端浸没在超纯水里。如果长时间不用，需将毛细管充满 CIEF 凝胶。

Agilent  $\mu\text{SIL-FC}$  毛细管在 pH 2.5 到 10.0 条件下可保持稳定，并且可承受短时间 0.1 mol/L 的 NaOH 冲洗，以去除污染物。不使用时，使用水和乙醇冲洗毛细管，然后干燥。室温下干燥保存。

### 4.3.3 活化 AB SCIEX 中性涂层 毛细管

1. 使用新的 AB SCIEX 中性涂层毛细管之前，先用 10 mmol/L 的磷酸以 900 mbar 的压力冲洗 4 分钟，然后用超纯水以 900 mbar 的压力冲洗 15 分钟
2. 每天首次运行前，先用超纯水以 900 mbar 的压力冲洗毛细管 15 分钟

#### 4.3.4 活化 Agilent $\mu$ SIL-FC 毛细管

1. 使用新的 Agilent  $\mu$ SIL-FC 毛细管之前，先用 350 mmol/L 乙酸以最大压力 (3.5 bar) 冲洗 5 分钟，然后用超纯水冲洗 2 分钟，接着用 0.5% 的甲基纤维素冲洗 5 分钟
2. 每天以及清洗毛细管后重复一遍步骤 1 中的清洗过程 (步骤 3)
3. 每进样六次后，使用 0.1 mol/L NaOH 以 1 bar 的压力冲洗毛细管 2 分钟，然后水冲洗 30 分钟，接着采用步骤 1 的方法活化毛细管

#### 4.3.5 制备阳极电解液和阴极电解液

	CIEF 凝胶 / MilliQ	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> / NaOH	终浓度
阳极电解液	818 $\mu$ L CIEF 凝胶	82 $\mu$ L 1.00 mol/L H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	91.1 mmol/L
阴极电解液	883 $\mu$ L MilliQ	17 $\mu$ L 1.00 mol/L NaOH	18.9 mmol/L

表 4.4 在 2 mL Eppendorf 管中制备用于压力迁移的阳极电解液和阴极电解液

	CIEF 凝胶 / MilliQ	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> / NaOH	终浓度
阳极电解液	720 $\mu$ L CIEF 凝胶 或 MilliQ	180 $\mu$ L 1.00 mol/L H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	200 mmol/L
阴极电解液	630 $\mu$ L MilliQ	270 $\mu$ L 1.00 mol/L NaOH	300 mmol/L

表 4.5 在 2 mL Eppendorf 管中制备用于化学迁移的阳极电解液和阴极电解液

1. 使用涡旋仪充分混匀阳极电解液和阴极电解液
2. 在 14000 rpm、20 °C 下离心电解液以及样品 5 分钟，去除里面的气泡和悬浮微粒
3. 将 600  $\mu$ L 阳极电解液和阴极电解液从 Eppendorf 管的上部转移到安捷伦缓冲液瓶

阳极电解液和阴极电解液需新鲜配制。两种电解液可用于 2-4 次分析，这取决于分析时间。

#### 4.3.6 制备占位剂

1. 用超纯水配制 500 mmol/L L-精氨酸的储备液用作阴极占位剂
2. 用超纯水配制 200 mmol/L 亚氨基二乙酸的储备液用作阳极占位剂

#### 4.3.7 制备化学迁移液

1. 用超纯水配制 22 或 350 mmol/L 乙酸溶液用作化学 CIEF 移动液

#### 4.3.8 制备 1% 甲基纤维素溶液

1. 将 15 mL 超纯水加热至约 80 °C
2. 边搅拌边缓慢加入 0.4 g 甲基纤维素粉末至热水中，并持续搅拌 5 分钟
3. 将溶液从加热器中取出，加入冰水至终体积 40 mL，然后混匀
4. 冷却溶液至 -20 °C，每 30 分钟混合一次直至冰冻
5. 将混合物于 4-8 °C 下储存过夜

#### 4.3.9 制备含有 3M 尿素的 0.6% 甲基纤维素溶液

1. 将 1.8 g 尿素加入到在 4.3.8 节中配制的 6 mL 1% 甲基纤维素溶液中
2. 加入超纯水至终体积约 9 mL
3. 混合至尿素完全溶解
4. 加入超纯水至终体积为 10 mL
5. 过滤溶液

#### 4.3.10 制备 0.5% 甲基纤维素溶液

1. 将 4.3.8 节中配制的 1% 甲基纤维素溶液用相同体积的超纯水稀释

#### 4.3.11 参数设置

表 4.6 展示了常规 CIEF 方法的设置，其中指示了压力和化学迁移的特殊设置。表 4.7 展示了单克隆抗体在 pH 为 5-8 范围内的一套参数设置。

## 毛细管电泳

初始位置值	储存盒温度	20.0 °C	
	进口瓶	6 (阳极液)	位置仅做参考
	出口瓶	7 (阴极液)	
补充液	未使用补充液		
预活化	冲洗	120 s	入口: 阳极液 出口: 废液
	冲洗	240 s	入口: 超纯水 出口: 废液
后活化	未进行后活化		
电参数	电场	打开	
	极性	正	
	电压	15.0 kV	压力迁移
		25.0 kV	化学迁移
	电流	20 µA	
	电源	6.0 W	
	低电流报警限	关闭	
进样	冲洗	200 s	入口: 样品 出口: 废液 充满毛细管
	载入入口瓶	超纯水	清洗步骤
	载入出口瓶	超纯水	清洗步骤
	静置		
工作时间	停止时间	45.0 min	适用于压力迁移
		60.0 min	适用于化学迁移
	后运行时间	关闭	
时间表	适用于压力迁移		
	0.1 min	改变电压	15 kV
	5.9 min	改变电压	15 kV
	6.0 min	改变电压	21 kV
	6.0 min	改变压力	内部压力: 48 mbar
	适用于化学迁移		
	0.1 min	改变电压	25 kV
	14.9 min	改变电压	25 kV
	15.0 min	改变电压	30 kV
	15.0 min	改变出口瓶	出口瓶: 乙酸

表 4.6 常规 CIEF 方法的设置，其中指示了压力和化学迁移的特殊设置（下页继续）

二极管阵列检测器		
设置	停止时间	与 CE 相同: 45 min (用于压力迁移) 与 CE 相同: 60 min (用于化学迁移)
	后运行时间	关闭
	响应时间	2.0 s
	峰宽	0.10 min
	分析前自动平衡	打开
	分析后自动平衡	关闭
光谱	全部	
信号	储存	信号/带宽 [nm]
	A: 是	270/4.0
	参比	关闭

仪器曲线 (储存数据)		
设置	采集电压	是
	采集电流	是
	采集功率	否
	采集压力	是
	采集温度	否

表 4.6 常规 CIEF 方法的设置，其中指示了压力和化学迁移的特殊设置（下页继续）

## 毛细管电泳

初始位置值	卡盒温度	20.0 °C	
	进口瓶	6 (阳极液)	位置仅做参考
	出口瓶	7 (阴极液)	
补充液	未使用补充液		
预活化	高压冲洗 3.5 bar	180 s	入口: 4.3 mol/L 尿素 出口: 废液
	高压冲洗 3.5 bar	120 s	入口: 超纯水 出口: 废液
后活化	高压冲洗 3.5 bar	120 s	入口: 超纯水 出口: 废液
电参数	电参数	打开	
	极性	正	
	电压	0 kV	
	电流	20 µA	
	电源	6.0 W	
	低电流报警限	关闭	
进样	高压冲洗 2.0 bar	100 s	入口: 样品 出口: 废液 充满毛细管
	载入入口瓶	超纯水	清洗步骤
	载出口瓶	超纯水	清洗步骤
	静置		
工作时间	停止时间	30 min	
	后运行时间	关闭	
时间表	0.17 min	改变电压	25 kV
	5.00 min	改变电压	25 kV
	5.01 min	改变电压	0 kV
	5.02 min	改变出口瓶	出口瓶: 乙酸
	5.03 min	改变电压	30 kV

## 二极管阵列检测器

设置	停止时间	与 CE 相同: 30.0 min	
	后运行时间	关闭	
	响应时间	2.0 s	
	峰宽	> 0.05 min	
	分析前自动平衡	打开	
	分析后自动平衡	关闭	
光谱	无		

表 4.7 抗体的 CIEF 分离参数设置, pI 范围从 5 到 8, 采用化学迁移法 (乙酸为电解质)。所有情况下均采用入口端高压冲洗 (下页继续)

二极管阵列检测器		
信号	储存	信号/带宽 [nm]
	A: 是	280/20
	参比	550/100
	B: 是	280/20
	参比	关闭
仪器曲线 (储存数据)		
设置	采集电压	是
	采集电流	是
	采集功率	否
	采集压力	是
	采集温度	否

表 4.7 抗体的 CIEF 分离参数设置, pI 范围从 5 到 8, 采用化学迁移法 (乙酸为电解质)。所有情况下均从入口端进行高压冲洗 (下页继续)

## 4.4 CIEF 方法实例

### 4.4.1 CIEF 分离 pI 范围从 9.68 至 4.51 的模型蛋白和多肽

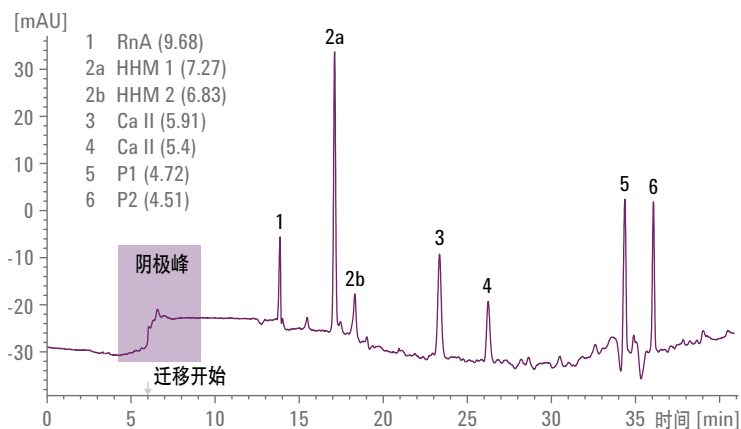


图 4.1 CIEF 分离 pI 范围从 9.68 至 4.51 的模型蛋白和多肽（压力迁移）

条件	
载体两性电解质	0.8 % (w/w) PL (3-10) 0.5 % (w/w) PL (5-6)
凝胶	CIEF 凝胶 (AB SCIEX)
占位剂	21.4 mM L-精氨酸 0.9 mM 亚氨基二乙酸
pI 标记物	0.43 mg/mL 核糖核酸酶 A (RnA) 38 µg/mL 马心脏肌红蛋白 (HHM) 36 µg/mL 碳酸酐酶 II (Ca II, 5.91) 45 µg/mL 碳酸酐酶 II (Ca II, 5.4) 10.2 µg/mL P1 5.4 µg/mL P2
阳极电解液	90.9 mM H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 及 CIEF 凝胶
阴极电解液	19.2 mM NaOH
进样	用样品冲洗 200 s
聚焦	6 min, +15.0 kV
迁移	48.0 mbar, +21.0 kV
毛细管	23.7 cm, 50 µm 内径 (eCAP, AB SCIEX)
温度	20.0 °C
检测	270 nm, 带宽 4 nm (无参比) 安装了 260 nm 带通检测器滤光片
扫描速率	2.5 Hz

#### 4.4.2 CIEF 分离 pI 范围从 7.27 至 4.51 的模型 蛋白和多肽

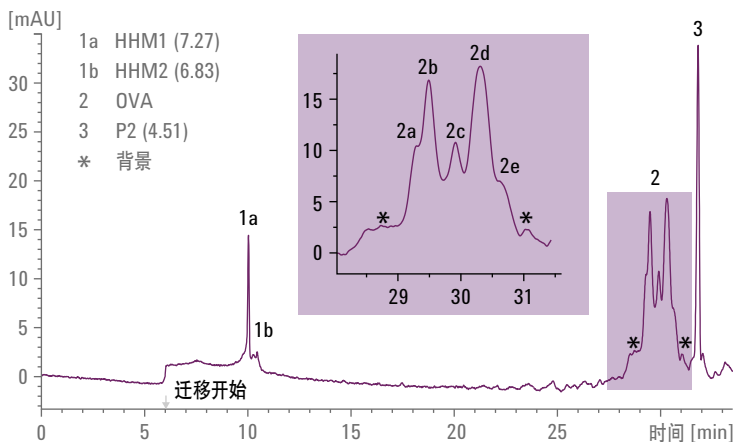


图 4.2 CIEF 分离 pI 范围从 7.27 至 4.51 的模型蛋白和多肽（压力迁移）

条件	
载体两性电解质	0.8 % (w/w) PL (3-10) 0.5 % (w/w) PL (5-6)
凝胶	CIEF 凝胶 (AB SCIEX)
pI 标记物	38 µg/mL 马心脏肌红蛋白 (HHM) 5.4 µg/mL P2
分析物	0.52 mg/mL 卵清白蛋白 (OVA)
阳极电解液	90.9 mM H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 及 CIEF 凝胶
阴极电解液	19.2 mM NaOH
进样	用样品冲洗 200 s
聚焦	6 min, +15.0 kV
迁移	48.0 mbar, +21.0 kV
毛细管	23.7 cm, 50 µm 内径 (eCAP, AB SCIEX)
温度	20.0 °C
检测	270 nm, 带宽 4 nm (无参比) 安装了 260 nm 带通检测器滤光片
扫描速率	2.5 Hz

### 4.4.3 CIEF 分离 pI 范围从 7.0 至 4.1 的模型蛋白和多肽

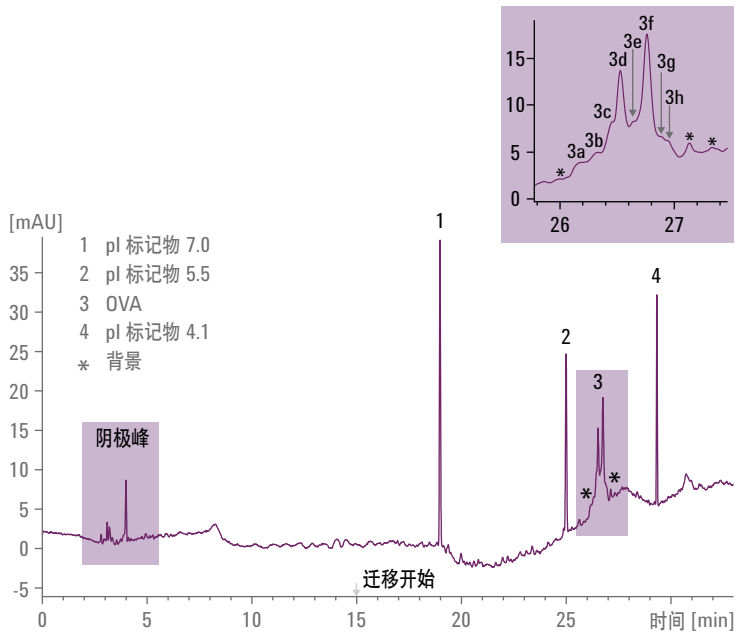


图 4.3 CIEF 分离 pI 范围从 7.0 至 4.1 的模型蛋白和多肽（采用乙酸进行化学迁移）

条件	
载体两性电解质	1.8% (w/w) PL (3-10) 0.3% (w/w) PL (5-6)
凝胶	CIEF 凝胶 (AB SCIEX)
占位剂	10.7 mM L-精氨酸 1.8 mM 亚氨基二乙酸
pI 标记物	多肽标记物, pI 4.1、5.5、7.0 (贝克曼库尔特)
分析物	0.36 mg/mL 卵清白蛋白 (OVA)
阳极电解液	200 mM H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 及 CIEF 凝胶
阴极电解液	300 mM NaOH
进样	用样品冲洗 200 s
聚焦	15 min, +25.0 kV
迁移	用 22 mM 的乙酸替换阴极电解液, 施加 +30.0 kV 的电压
毛细管	23.9 cm, 50 μm 内径 (eCAP, AB SCIEX)
温度	20 °C
检测	270 nm, 带宽 4 nm (无参比) 安装了 260 nm 带通检测器滤光片
扫描速率	2.5 Hz

#### 4.4.4 CIEF 分离 pI 范围从 5 至 8 的单克隆抗体和多肽

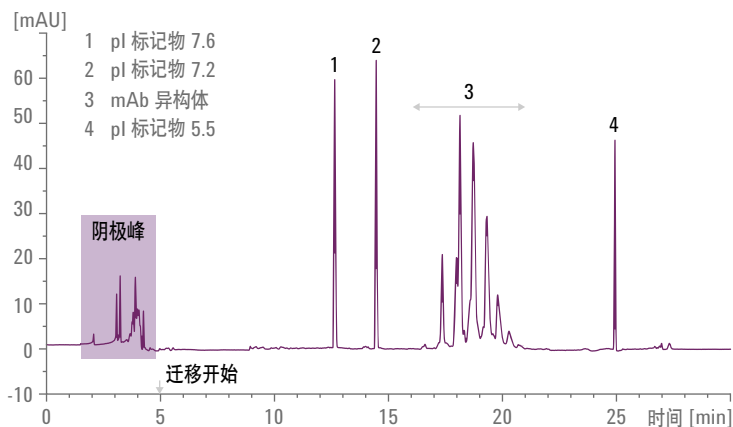


图 4.4 CIEF 分离 pI 范围从 5 至 8 的模型蛋白和多肽（采用乙酸进行化学迁移）

条件	
载体两性电解质	2.5% (w/w) PL (5-8)
凝胶	0.5% 甲基纤维素, 含 2.5 M 尿素
占位剂	19 mM L-精氨酸; 8.4 mM 亚氨基二乙酸
pI 标记物	多肽标记物, pI 5.5、7.2 和 7.6 (Sigma-Aldrich 和 AB SCIEX)
分析物	0.092 mg/mL 脱盐大鼠抗 DYKDDDDK 单克隆抗体
阳极电解液	200 mM H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>
阴极电解液	300 mM NaOH
进样	用样品高压冲洗 (2 bar) 100 s
聚焦	5 min, +25.0 kV
迁移	用 350 mM 乙酸替换阴极电解液, 施加 +30.0 kV 的电压
毛细管	24.5 cm, 50 μm 内径 (Agilent μSIL-FC)
温度	20 °C
检测	280 nm, 带宽 20 nm, 参比 550 nm, 带宽 100 nm 安装了 280 nm 高通检测器滤光片
扫描速率	5 Hz

---

## 参考文献

1. Kálmán-Szekeres, Z., Olajos, M., Ganzler, K., Analytical aspects of biosimilarity issues of protein drugs, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2012**, *69*, 185
2. Kohlrausch, F., Über Konzentrations-Verschiebungen durch Elektrolyse im Inneren von Lösungen und Lösungsgemischen, *Annalen der Physik und Chemie*, **1897**, *62*, 14
3. Tiselius, A., A new apparatus for electrophoretic analysis of colloidal mixtures, *Transactions of the Faraday Society*, **1937**, *33*, 524
4. Tiselius, A., Flodin, P., Zone Electrophoresis, *Advances in Protein Chemistry*, **1953**, *8*, 461
5. Gel Electrophoresis of Proteins, Hames, B.H., Rickwood, D., Eds., Oxford University Press, New York, **1990**
6. Schwartz, D.C., Cantor, C.R., Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis, *Cell*, **1984**, *37(1)*, 67
7. O' Farrell, P.H., High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins, *Journal of Biological Chemistry*, **1975**, *250(10)*, 4007
8. Hjertén, S., Free Zone Electrophoresis, *Chromatographic Reviews*, **1967**, *9(2)*, 122
9. Mikkers, F.E.P., Everaerts, F.M., Verheggen, Th.P.E.F., High Performance Zone Electrophoresis, *Journal of Chromatography*, **1979**, *169*, 11
10. Jorgenson, J.W., Lukacs, K.D., Zone electrophoresis in open-tubular glass capillaries, *Analytical Chemistry*, **1981**, *53*, 1298
11. Righetti, P.G. in Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Burdon, R.H., van Knippenberg, P.H., Eds., Elsevier Science Publishers, **1990**, p13
12. Righetti, P.G., Simó, C., Sebastiano, R., Citterio, A., Carrier ampholytes for IEF, on their fortieth anniversary (1967-2007), brought to trial in court: The verdict, *Electrophoresis*, **2007**, *28(21)*, 3799
13. Liu, X., Sosic, Z. Krull, I.S., Capillary isoelectric focusing as a tool in the examination of antibodies, peptides and proteins of pharmaceutical interest, *Journal of Chromatography A*, **1996**, *735(1-2)*, 165

14. Zhu, M., Rodriguez, R., Wehr, T., Optimizing separation parameters in capillary isoelectric focusing, *Journal of Chromatography A*, **1991**, 559(1-2), 479
15. Bjellqvist, B., Ek, K., Righetti, P.G., Gianazza, E., Görg, A., Westermeier, R., Postel, W., Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: Principle, methodology and some applications, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, **1982**, 6(4), 317
16. Görg, A., Drews, O., Lück, C., Weiland, F., Weiss, W., 2-DE with IPGs, *Electrophoresis*, **2009**, 30, 122
17. Hochstrasser, D., Augsbürger, V., Funk, M., Appel, R., Pellegrini, C., Müller, A. F., Immobilized pH gradients in capillary tubes and two-dimensional gel electrophoresis, *Electrophoresis*, 1986, 5, 505
18. Hjertén, S., Zhu, M., Adaptation of the equipment for high-performance electrophoresis to isoelectric focusing, *Journal of Chromatography*, **1985**, 346, 265
19. Mazzeo, J. R., Krull, I. S., Capillary Isoelectric Focusing of Proteins in Uncoated Fused-Silica Capillaries Using Polymer Additives, *Analytical Chemistry*, **1991**, 63, 2852
20. Mazzeo, J. R., Martineau, J. A., Krull, I. S., Peptide mapping using EOF-driven capillary isoelectric focusing, *Analytical Biochemistry*, **1993**, 208, 323
21. Thormann, W., Caslavská, J., Molteni, S., Chmelik, J., Capillary isoelectric focusing with electroosmotic zone displacement and on-column multichannel detection, *Journal of Chromatography*, **1992**, 589, 321
22. Kilar, F., Végvári, F. A., Mód, A., New set-up for capillary isoelectric focusing in uncoated capillaries, *Journal of Chromatography A*, **1998**, 813, 349
23. Schwer, C., Capillary isoelectric focusing: A routine method for protein analysis, *Electrophoresis*, **1995**, 16, 2121
24. Shen, Y., Smith, R. D., High-resolution capillary isoelectric focusing of proteins using highly hydrophilic substituted cellulose-coated capillaries, *Journal of Microcolumn Separations*, **2000**, 12(3), 135
25. Chen S.-M., Wiktorowicz, J.E., Isoelectric focusing by free solution capillary electrophoresis, *Analytical Biochemistry*, **1992**, 206(1), 84

26. Wu, J., Pawlyszin, J., Universal detection for capillary isoelectric focusing without mobilization using concentration gradient imaging system, *Analytical Chemistry*, **1992**, *64*(1), 227
27. <http://www.proteinsimple.com> (accessed December 20, 2013)
28. Lauer, H.H., Rozing, G.P., High Performance Capillary Electrophoresis, *Agilent Technologies Primer*, publication number 5990-3777EN, **2010**
29. Cruzado-Park, I.D., Mack, S., Ratnayake, C.K., Identification of System Parameters Critical for High-Performance cIEF, *Beckman-Coulter Application Information*, document A-11634A, **2008**
30. Sebastiano, R., Simó, C., Mendieta, M.E., Antonioli, P., Citterio, A., Cifuentes, A., Peltre, G., Righetti, P.G., Mass distribution and focusing properties of carrier ampholytes for isoelectric focusing: I. Novel and unexpected results, *Electrophoresis*, **2006**, *27*, 3919
31. Chen, A.B., Rickel, C.A., Flanigan, A., Hunt, G., Moorhouse, K.G., Comparison of ampholytes used for slab gel and capillary isoelectric focusing of recombinant tissue-type plasminogen activator glycoforms, *Journal of Chromatography A*, **1996**, *744*(1-2), 279
32. Mosher, R.A., Thormann, W., High-resolution computer simulation of the dynamics of isoelectric focusing: In quest of more realistic input parameters for carrier ampholytes, *Electrophoresis*, **2008**, *29*(5), 1036
33. Mack, S., Cruzado-Park, I., Chapman, J., Ratnayake, C., Vigh, G., A systematic study in cIEF: Defining and optimizing experimental parameters critical to method reproducibility and robustness, *Electrophoresis*, **2009**, *30*(23), 4049
34. Righetti, P.G., Determination of the isoelectric point of proteins by capillary isoelectric focusing, *Journal of Chromatography A*, **2004**, *1037*(12), 491
35. Shimura, K., Zhi, W., Matsumoto, H., Kasai, K., Accuracy in the determination of isoelectric points of some proteins and a peptide by capillary isoelectric focusing: Utility of synthetic peptides as isoelectric point markers, *Analytical Chemistry*, **2000**, *72* (19), 4747
36. Conti, M., Galassi, M., Bossi, A., Righetti, P.G., Capillary isoelectric focusing: The problem of protein solubility, *Journal of Chromatography A*, **1997**, *757*(1-2), 237

37. Lin, M-F., Williams, C., Murray, M.V., Conn, G., Ropp, P.A., Ion chromatographic quantification of cyanate in urea solutions: Estimation of the efficiency of cyanate scavengers for use in recombinant protein manufacturing, *Journal of Chromatography B.*, **2004**, *803(2)*, 353
38. McCarthy, J., Hopwood, F., Oxley, D., Laver, M., Castagna, A., Righetti, P.G., Williams, K., Herbert, B., Carbamylation of proteins in 2-d electrophoresis; myth or reality? *Journal of Proteome Research*, **2003**, *2(3)*, 239
39. Thormann, W., Huang, T., Pawliszyn, J., Mosher, R.A., High-resolution computer simulation of the dynamics of isoelectric focusing of proteins, *Electrophoresis*, **2004**, *25(2)*, 324
40. Lopez-Soto-Yarritu, P., Diez-Masa, J.C., Cifuentes, A., de Frutos, M., Improved capillary isoelectric focusing method for recombinant erythropoietin analysis, *Journal of Chromatography A.*, **2002**, *968(12)*, 221
41. Schmitt, Ph., Poiger, T., Simon, R., Freitag, D., Kettrup, A., Garrison, A.W., Simultaneous Determination of Ionization Constants and Isoelectric Points of 12 Hydroxy-s-Triazines by Capillary Zone Electrophoresis and Capillary Isoelectric Focusing, *Analytical Chemistry*, **1997**, *69*, 2559
42. Khawli, L.A. et al, Charge variants in IgG1 Isolation, characterization, in vitro binding properties and pharmacokinetics in rats, *mAbs*, **2010**, *2*, 613
43. Righetti, P.G., Sebastiano, R., Citterio, A., Capillary electrophoresis and isoelectric focusing in peptide and protein analysis, *Proteomics*, **2013**, *13*, 325
44. Clarke, G.M., Higgins, T.N., Laboratory Investigation of Hemoglobinopathies and Thalassemias: Review and Update, *Clinical Chemistry*, **2000**, *46*, 1284



