

文章编号: 1008-9357(2025)05-0412-08

DOI: 10.14133/j.cnki.1008-9357.20250326001

基于 *N,N*-二甲基丙烯酰胺聚合物溶液流变性能及其在毛细管电泳分离 DNA 中的应用

苗贵兰¹, 陈学峰², 张吉保², 鲁斌¹, NUSRULLAH Mehtab¹, 龚昀晗¹,
朱良宇¹, 范倩云¹, 王延梅¹

(1. 中国科学技术大学化学与材料科学学院, 合肥 230026; 2. 南京溯远基因科技有限公司, 南京 211899)

摘要: 通过水溶液聚合合成了 *N,N*-二甲基丙烯酰胺(DMA)的均聚物(PDMA)及与丙烯酰胺(AM)的共聚物(P(DMA-co-AM))。研究了特性黏数、AM 和 DMA 的物质的量之比、温度、剪切速率等对聚合物溶液流变性能的影响, 并将 PDMA 与 P(DMA-co-AM) 应用于毛细管电泳分离 DNA 片段的筛分介质。流变性能研究结果表明, 随着 AM 含量的增加, P(DMA-co-AM) 的特性黏数增加, 聚合物在缓冲溶液中形成的 DNA 分离溶液的黏度也随之增大; 恒剪切速率下, 当温度从 25 °C 升高至 60 °C 时, 较高分子量的 PDMA 溶液黏度下降了 57.0%, 而较低分子量的 P(DMA-co-AM) 溶液黏度下降了 50.8%; 与 PDMA 溶液相比, P(DMA-co-AM) 溶液能更好地抵抗环境温度的变化。DNA 片段分析结果表明, 随着 AM 含量的增加, 相较于较低分子量的 P(DMA-co-AM) 溶液, 较高分子量的 P(DMA-co-AM) 溶液对大分子片段的分离度增加, 且重现性良好。

关键词: *N,N*-二甲基丙烯酰胺; 聚合物溶液; 流变学; 毛细管电泳; DNA 片段分离

中图分类号: O63

文献标志码: A

Rheological Properties of Polymer Solution Based on *N,N*-Dimethylacrylamide and Its Application in DNA Separation by Capillary Electrophoresis

MIAO Guilan¹, CHEN Xuefeng², ZHANG Jibao², LU Bin¹, NUSRULLAH Mehtab¹, GONG Yunhan¹,
ZHU Liangyu¹, FAN Qianyun¹, WANG Yanmei¹

(1. School of Chemistry and Materials Science, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China;
2. Nanjing Suyuan Gene Technology Co Ltd, Nanjing 211899, China)

Abstract: The homopolymer (PDMA) of *N,N*-dimethylacrylamide (DMA) and the copolymer (P(DMA-co-AM)) of DMA and acrylamide (AM) were synthesized by aqueous solution polymerization. The effects of intrinsic viscosity, the molar ratio of AM to DMA, temperature and shear rate on the rheological behaviors of polymer solution were studied, and the corresponding polymer solution was used as a separation medium for DNA fragments analysis using capillary electrophoresis.

收稿日期: 2025-03-26

作者简介: 苗贵兰(2000—), 女, 山东德州人, 硕士, 主要研究方向为聚合物溶液的流变学研究及 DNA 片段分析。E-mail: miaolan@mail.ustc.edu.cn

通信联系人: 王延梅, E-mail: wangyanm@ustc.edu.cn

引用格式: 苗贵兰, 陈学峰, 张吉保, 鲁斌, NUSRULLAH Mehtab, 龚昀晗, 朱良宇, 范倩云, 王延梅. 基于 *N,N*-二甲基丙烯酰胺聚合物溶液流变性能及其在毛细管电泳分离 DNA 中的应用 [J]. 功能高分子学报, 2025, 38(5): 412-419.

Citation: MIAO Guilan, CHEN Xuefeng, ZHANG Jibao, LU Bin, NUSRULLAH Mehtab, GONG Yunhan, ZHU Liangyu, FAN Qianyun, WANG Yanmei. Rheological Properties of Polymer Solution Based on *N,N*-Dimethylacrylamide and Its Application in DNA Separation by Capillary Electrophoresis [J]. Journal of Functional Polymers, 2025, 38(5): 412-419.

The study of rheological behaviors show that with increasing the AM content the intrinsic viscosity of P(DMA-*co*-AM) increased, and the viscosity of the DNA separation solution formed by the polymer in the buffer solution increased. When the temperature increased from 25 °C to 60 °C at a constant shear rate, the viscosity of PDMA separation solution with higher molecular weight decreased by 57.0%, while the viscosity of P(DMA-*co*-AM) solution with higher molecular weight decreased by about 50.8%. Compared with the PDMA solution, P(DMA-*co*-AM) solution could better resist the environmental temperature change. The results of DNA fragment analysis show that with increasing the AM content, the P(DMA-*co*-AM) solution with higher molecular weight obtained a higher resolution on the separation of big fragments of DNA and better reproducibility compared with the P(DMA-*co*-AM) solution with lower molecular weight.

Key words: *N,N*-dimethylacrylamide; polymer solution; rheology; capillary electrophoresis; DNA fragments separation

毛细管电泳(Capillary Electrophoresis, CE)作为一种高效分离技术,在生物医学与化学分析领域具有重要的应用价值^[1],其基于带电粒子在电场作用下迁移率的不同实现组分分离,兼具分离度高、分析速率快、检测灵敏、微量进样及自动化等优势^[2,3]。毛细管无胶筛分电泳作为CE的一种关键技术,通过非交联聚合物溶液构建动态缠结网络,实现按尺寸分离DNA片段的目的^[4]。相较于传统凝胶体系,毛细管无胶筛分电泳无需制胶过程,具有操作流程简单、分离度高、运行成本低等特点^[5],现已发展为DNA分析领域的核心技术^[6]。

目前,非交联高分子溶液作为无胶筛分体系在CE技术中占据主导地位,主要包括均聚物、共聚物及混合物等。高分子量线形聚丙烯酰胺(LPAM)虽能实现DNA高效分离与测序,但其高黏度特性导致自动化进样受限^[7],且因缺乏自涂覆能力,在熔融石英毛细管中易引发电渗流,导致分离度下降。相较而言,聚*N,N*-二甲基丙烯酰胺(PDMA)通过侧基上的甲基与毛细管内壁的疏水相互作用,表现出动态涂覆功能,可显著抑制电渗流^[8],其适中的黏度特性亦适配DNA测序的需求^[9],但筛分性能相对LPAM仍显不足。为协同优化涂覆性能、黏度与筛分性能,Wang课题组^[10-12]在聚丙烯酰胺(PAM)水溶液中聚合*N,N*-二甲基丙烯酰胺(DMA)得到PAM/PDMA准互穿聚合物网络;Zhang等^[13]通过将PAM接枝到PDMA上得到共聚物来进行毛细管电泳筛分DNA。

在毛细管无胶筛分体系中,尽管高分子量的聚合物可显著提高大片段DNA的分离度(R_D),但其高黏度导致灌注不易自动化、冲洗困难和迁移时间较长等问题^[14]。此外,当聚合物溶液通过毛细管时,毛细管两端的电压产生的高剪切力会破坏聚合物溶液的网络结构稳定性,导致分离结果重现性变差^[15,16]。目前,有关筛分聚合物溶液的流变行为与DNA片段分离之间的关系研究尚鲜有报道,因此,针对剪切速率与温度对聚合物溶液黏度及网络稳定性的影响规律作深入研究,可为优化筛分介质提供理论依据。

本文通过水溶液聚合合成了具有自涂覆能力且黏度较低的PDMA及DMA与丙烯酰胺(AM)的共聚物(P(DMA-*co*-AM))。研究了PDMA和P(DMA-*co*-AM)作为DNA筛分介质时,剪切速率、温度、共聚单体AM含量等因素对筛分介质黏度的影响,最后将其应用于DNA片段分析,研究不同筛分介质对分离结果的影响。

1 实验部分

1.1 原料和试剂

DMA($w > 99.0\%$):阿拉丁化学试剂(上海)有限公司,使用前采用减压蒸馏纯化;AM($w = 99.0\%$):阿拉丁化学试剂(上海)有限公司,在氯仿中两次重结晶纯化;过硫酸铵(APS, $w = 99.99\%$)、尿素(Urea, $w \geq 99.5\%$):阿拉丁化学试剂(上海)有限公司;异丙醇:分析纯,国药集团化学试剂有限公司,使用前经氯化钙干燥,常压蒸馏纯化;四甲基乙二胺(TEMED, $w > 99.0\%$)、三(羟甲基)氨基甲烷(Tris-Base, $w \geq 99.7\%$)、*N*-三(羟甲基)甲基-3-氨基丙磺酸(TAPs, $w \geq 99.5\%$)、乙二胺四乙酸(EDTA, $w \geq 99.4\%$):Sigma-Aldrich化学有限公司;重水(D_2O , 氘(D)的丰度为99.9%):安耐吉安徽泽升科技有限公司;标准DNA样品:Y41SE荧光检测试剂盒(LN23E01L),江苏苏博生物医学科技南京有限公司;本工作使用的水是由实验室水净化系统(上海和泰仪器有限公司)制备的超纯水($18.2 M\Omega \cdot cm$)。

1.2 测试与表征

核磁共振氢谱(¹H-NMR): 采用瑞士 BRUKER Biospin 公司 AVANCE III HD 400 型核磁共振氢谱仪测试。取干态样品溶于 0.55 mL D₂O 中, 配制质量浓度(ρ)为 0.020~0.025 g/mL 的聚合物溶液, 固定磁场强度, 扫场 128 次进行组分分析。

傅里叶变换红外光谱(FT-IR): 采用美国 Thermo Fisher Scientific 公司 NICOLET 6700 型傅里叶变换红外光谱仪测试。光谱范围为 4000~400 cm⁻¹, 扫描 64 次, 分辨率为 8 cm⁻¹。

热重分析(TGA): 采用日本 Shimadzu 公司 DTG-60 H 型热重分析仪测定聚合物的热分解温度(T_d)。将样品以 10 °C/min 的加热速率从室温加热到 700 °C, 氮气气氛, 流速为 30 mL/min。

差示扫描量热分析(DSC): 采用日本 Shimadzu 公司 DSC-60 型差示扫描量热仪测玻璃化转变温度(T_g)。将样品在氮气氛围下, 以 10 °C/min 的速率从室温加热至 220 °C, 测试前进行升降温循环以消除热历史效应。

特性黏数($[\eta]$): 采用黏度法, 利用乌氏黏度计在 25 °C 下测量聚合物在超纯水中的 $[\eta]$ ^[17]。首先, 将聚合物溶于超纯水中, 于容量瓶中配成 1 mg/mL 的溶液; 接着, 取 10 mL 溶液于乌氏黏度计中, 在 25 °C 下测量流经时间; 然后, 将 1 mg/mL 的聚合物溶液分别稀释至 2/3、1/2、1/3、1/4 mg/mL, 测量不同质量浓度下溶液的流经时间, 再测量超纯水的流经时间, 通过流经时间计算出相对黏度(η_r)和增比黏度(η_{sp}), 通过 $\ln(\eta_r/\rho) \sim \rho$ 、 $\eta_{sp}/\rho \sim \rho$ 作图, 外推到质量浓度为 0, 得到 $[\eta]$ 。同时, 根据 $[\eta]$ 的大小得到聚合物的缠结浓度理论值(φ_e , $\varphi_e \approx 1.5/[\eta]$)^[18]。

1.3 PDMA 和 P(DMA-co-AM)的合成

首先, 将一定量的 DMA 溶于超纯水中(0.9038 mol/L), 加入链转移剂异丙醇, 磁力搅拌器搅拌(500 r/min), 通入氮气 1 h 后加入 APS(0.1 g/mL)和 TEMED($n(\text{APS}):n(\text{TEMED})=1:1$), 在 25 °C 下反应 4 h。反应结束后, 于纯水中用透析袋(截留分子量为 1.4×10^4)透析, 冷冻干燥后得到 DMA 的均聚物 PDMA。

保持 DMA 和 AM 单体的总物质的量不变, 改变 DMA 和 AM 单体的物质的量之比, 用上述方法得到共聚物 P(DMA-co-AM)。当 AM 和 DMA 物质的量之比分别为 0.02、0.04 时, 相应的共聚物分别命名为 P(DMA-co-AM_{0.02})、P(DMA-co-AM_{0.04})。

1.4 流变学性能测定

采用美国 TA 公司 Discovery HR-2 型旋转流变仪进行剪切测试和流变学分析, 锥角为 59'41", 锥板直径为 40 mm, 测试间隙为 0.050 mm。将聚合物溶解在 DNA 片段分析缓冲液(1×TTE+7 mol/L Urea: 50 mmol/L Tris-Base, 50 mmol/L TAPS, 2 mmol/L EDTA, 7 mol/L Urea, 溶剂为超纯水)中, 配制成 0.045 g/mL 的溶液, 样品在测试前于恒温环境中静置 24 h。

黏度(η): 分别在 25、60 °C 的条件下, 采用恒剪切速率($\dot{\gamma} = 1.32 \text{ s}^{-1}$)模式测量溶液的 η , 待数据稳定后以线性模式采集数据点。

黏度随剪切速率变化曲线: 分别在 25、60 °C 的条件下, 使用稳态剪切速率扫描($\dot{\gamma}$ 为 0.001~1000 s⁻¹), 用对数模式选取数据点得到稳态流变曲线^[16]。

黏度随温度变化曲线: 在恒定剪切速率($\dot{\gamma} = 1.32 \text{ s}^{-1}$)下测量 25~60 °C 区间内溶液黏度的变化, 数据稳定后以线性模式采集数据点, 基于 Arrhenius 方程(公式(1))进行数学模型拟合^[19]。

$$\eta = A e^{\frac{E_a}{RT}} \quad (1)$$

其中: A 为指前因子; E_a 为黏流活化能, 单位为 kJ/mol; T 为绝对温度, 单位为 K; R 为气体常数。

流体模型: 幂律方程采用黏性流动方程(公式(2))^[20]。

$$\eta = \tau/\dot{\gamma} = k\dot{\gamma}^{n-1} \quad (2)$$

其中, τ 为剪切应力; k 为流体的稠度系数; n 为非牛顿指数。

1.5 DNA 片段分析

采用南京溯远基因科技有限公司配备激光诱导荧光检测器的 Classic 116 型基因分析仪, 激发波长 505 nm, 采用 16 通道毛细管阵列, 单根毛细管全长 47 cm(有效分离长度 36 cm), 内径 50 μm , 外径 360 μm 。

将聚合物溶解在 1×TTE+7 mol/L Urea 中, 配制质量浓度为 0.045 g/mL 的聚合物溶液, 注入和洗出筛分介质的压强为 800 psi(1 psi = 6894.76 Pa), 电流为 1450 mA; 阳极杯溶液为 1×TTE+7 mol/L Urea, DNA 标准样品

进样时间 18 s, 进样电压 1.2 kV, 分离电场强度 15 kV, 温度 60 °C, 用基因分析仪对标准 DNA 样品进行分析。

以 (114/120)bp、(214/220)bp、(314/320)bp、(414/420)bp 和 (514/520)bp DNA 片段作为 R_D 的计算来源。同时拟合不同碱基数目 DNA 片段的迁移时间与碱基数的线性回归系数 (R^2), 评估对大片段 DNA 筛分的偏移。 R_D 通过公式(3)进行计算^[21]:

$$R_D = \sqrt{2 \ln 2} (t_2 - t_1) / (W_2 + W_1) \tag{3}$$

其中: W_1 和 W_2 分别为峰 1 和峰 2 的半峰宽, t_1 和 t_2 分别为 DNA 片段 1 和 2 的迁移时间, 并且 $t_2 > t_1$ 。

将内标 560、580、600 这 3 个峰高 (H) 总和除以 100、120、140 这 3 个峰高的总和 (公式(4)) 得到毛细管电泳筛分 DNA 片段的峰衰程度 (ΔH), 用于评估毛细管电泳分离 DNA 片段的均衡性。

$$\Delta H = (H_{560} + H_{580} + H_{600}) / (H_{100} + H_{120} + H_{140}) \tag{4}$$

2 结果与讨论

2.1 聚合物的表征

通过调节异丙醇用量来调节 PDMA 及其共聚物的特性黏数, 合成了特性黏数均值分别为 196、226 mL/g 的两个特性黏数系列 (即黏均分子量较低和较高) 聚合物, 相应系列聚合物的性能如表 1 所示。P(DMA-*co*-AM) 的 ¹H-NMR 谱图如图 1 所示。PDMA 侧基上的甲基质子峰 (-CH₃) 化学位移约为 3.0, PDMA 的亚甲基质子峰 (-CH₂) 化学位移约为 1.6, PDMA 链上次亚甲基峰 (-CH) 约为 2.6; AM 结构单元 -CH₂ 峰化学位移与 PDMA 相同, -CH 的化学位移约为 2.2, 通过 DMA 结构单元上的 -CH₃ 与 AM 结构单元上的 -CH 峰面积比计算出共聚物中 AM 与 DMA 的物质的量之比, 结果列于表 1 中, 基本与单体投料比一致。在单体总物质的量不变的情况下, 随 AM 结构单元含量的增加, 共聚物的特性黏数也随之增加 (表 1), 表明 AM 的加入可能使氢键相互作用增强, 从而使特性黏数增大^[22]。特性黏数与分子量呈线性关系, 因此特性黏数越大, 分子量越大。

表 1 聚合物的性能

Table 1 Properties of polymers

Sample	$n(\text{AM}):$ $n(\text{DMA})$	$[\eta]/(\text{mL} \cdot \text{g}^{-1})$	$T_d/^\circ\text{C}$	$T_g/^\circ\text{C}$	$\phi_e/(\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$
PDMA-196	0	197.64	380.4	124.3	0.007 6
P(DMA- <i>co</i> -AM _{0.02})-196	0.02	194.84	309.9	132.4	0.007 7
P(DMA- <i>co</i> -AM _{0.04})-196	0.05	196.55	307.2	133.9	0.007 6
PDMA-226	0	219.80	401.4	124.6	0.006 8
P(DMA- <i>co</i> -AM _{0.02})-226	0.02	223.53	396.5	127.8	0.006 7
P(DMA- <i>co</i> -AM _{0.04})-226	0.03	237.14	390.3	130.7	0.006 3

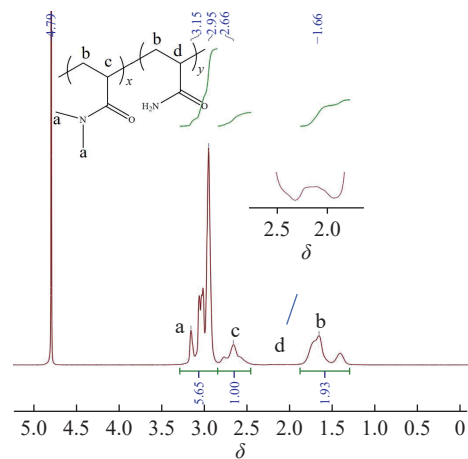


图 1 P(DMA-*co*-AM) 的 ¹H-NMR 谱图

Fig. 1 ¹H-NMR spectrum of P(DMA-*co*-AM)

PDMA 和 P(DMA-*co*-AM) 的红外光谱如图 2(a) 所示。在 3370 cm⁻¹ 处的宽峰为 O-H 伸缩振动峰, 这可能是聚合物中残留的水分所致, 在 2936 cm⁻¹ 处尖峰为 C-H 伸缩振动峰, 在 1623 cm⁻¹ 处的尖峰为侧基上 C=O 伸缩振动峰, P(DMA-*co*-AM) 的 C-H 伸缩振动峰面积占 C=O 伸缩振动峰面积的 19.0%, 而相应峰的比例在 PDMA 中为 25.3%, 和 PDMA 相比, P(DMA-*co*-AM) 中的甲基含量更少。

PDMA、P(DMA-*co*-AM) 的热重分析曲线如图 2(b) 所示。聚合物在 100 °C 前均有不同程度的质量损失, 这是由聚合物中水分蒸发造成的。此外, P(DMA-*co*-AM) 有 3 个阶段的失重: 第 1 个阶段的失重可能是聚合物链内或链间酰胺基团之间的分子间和分子内酰亚胺化脱水产生质量损失, 随着 AM 含量的增加, 起始的 T_d

随之减小;第2个阶段的失重是由于酰亚胺分解形成腈基并释放二氧化碳产生质量损失;第3个阶段的失重是由于随机主链断裂分解,导致最终的质量损失。PDMA有2个阶段的失重,与P(DMA-co-AM)的第2、3个阶段相同。

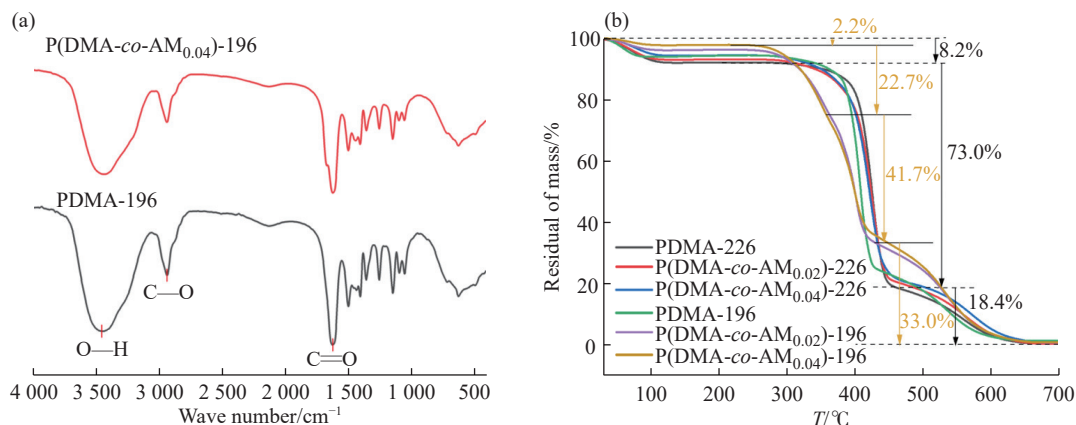


图2 PDMA、P(DMA-co-AM)的(a) FT-IR谱图和(b) TGA曲线
Fig. 2 (a) FT-IR spectra and (b) TGA curves of PDMA and P(DMA-co-AM)

通过DSC测得聚合物的 T_g 如表1所示。随着AM含量的增加, T_g 也随之增加,且只有一个,这些均表明成功合成了共聚物。

2.2 剪切速率、温度对聚合物溶液流变性能的影响

为了更好地模拟聚合物溶液在毛细管中的行为,本研究将表1列出的聚合物溶解在 $1 \times \text{TTE} + 7 \text{ mol/L urea}$ 中进行流变测试。配制质量浓度为 0.045 g/mL 的聚合物溶液,该质量浓度远高于聚合物的缠结浓度理论值($0.0063 \sim 0.0077 \text{ g/mL}$),处于亚浓溶液区,此时高分子链团相互接触缠结形成网络结构^[16],有利于对DNA片段的分离。图3(a、b)所示为聚合物溶液在 25 、 60 °C时黏度随剪切速率的变化曲线。当剪切速率为 1.32 s^{-1} 时,聚合物溶液黏度随AM含量的增加而增加,尽管P(DMA-co-AM)_{0.02}-196的特性黏数低于PDMA-196的相应值,但黏度仍高于后者,说明AM的加入使共聚物分子内、分子间以及和水分子之间的氢键相互作用增强,从而提高了共聚物溶液的黏度。随剪切速率的增加,聚合物溶液表现出剪切变稀的非牛顿特性。

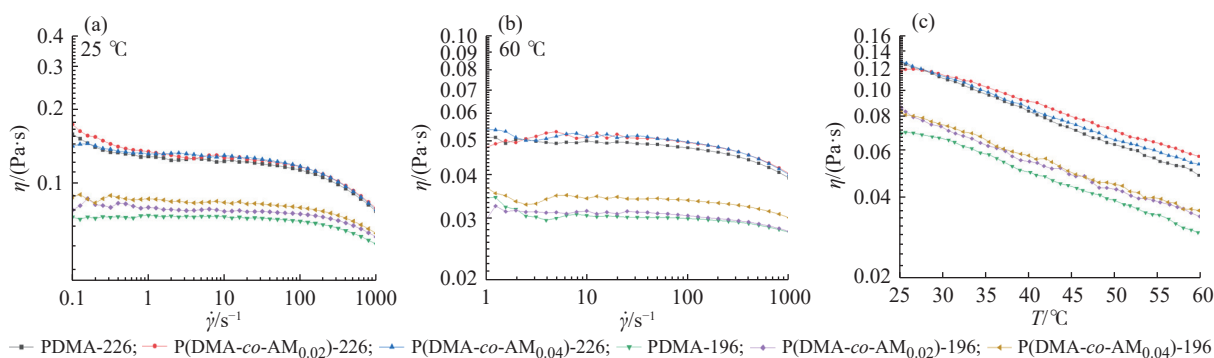


图3 (a) 25 °C时黏度随剪切速率的变化;(b) 60 °C时黏度随剪切速率的变化;(c) 当剪切速率为 1.32 s^{-1} 时,黏度随温度的变化
Fig. 3 (a) Change of viscosity with shear rate at 25 °C; (b) Change of viscosity with shear rate at 60 °C; (c) Change of viscosity with temperature at shear rate of 1.32 s^{-1}

在公式(2)中,当 $n = 1$ 时,此时的流体为牛顿流体;当 $n < 1$ 时,流动则表现为剪切变稀的行为,对应的流体为假塑性流体^[20]; n 值越大,偏离牛顿流体越远,黏度随 $\dot{\gamma}$ 增大而降低,流动性增强,聚合物溶液的剪切变稀行为越强。当聚合物溶液在剪切速率为 1.32 s^{-1} 时,根据公式(2)得到 25 、 60 °C下的 n 值列于表2。P(DMA-co-AM)-226系列聚合物溶液比P(DMA-co-AM)-196系列聚合物溶液的 n 值小,且随着黏度增加 n 值下降。随AM含量增加,氢键相互作用增强, n 值越小,共聚物溶液的非牛顿性的量度(n 与1之差)增大。分子量增加或分子间相互作用增强均会增大聚合物溶液剪切变稀的程度。剪切变稀使聚合物溶液更容易进入毛细管,有利于毛细管电泳筛分介质的自动进料。

表 2 当剪切速率为 1.32 s^{-1} 时, 聚合物溶液的黏度和非牛顿指数
Table 2 Viscosity at different temperatures and non-newtonian index (shear rate of 1.32 s^{-1})

Sample	$\eta/(\text{Pa}\cdot\text{s})$		n	
	25 °C	60 °C	25 °C	60 °C
PDMA-196	0.0742	0.0309	0.8948	0.9533
P(DMA-co-AM _{0.02})-196	0.0800	0.0316	0.8942	0.9519
P(DMA-co-AM _{0.04})-196	0.0844	0.0368	0.8828	0.9422
PDMA-226	0.1259	0.0499	0.8310	0.9022
P(DMA-co-AM _{0.02})-226	0.1440	0.0526	0.8223	0.8997
P(DMA-co-AM _{0.04})-226	0.1465	0.0533	0.8159	0.8949

当剪切速率为 1.32 s^{-1} 时, 温度分别为 25、60 °C 下聚合物溶液的黏度列于表 2。P(DMA-co-AM)-226 系列聚合物溶液整体比 P(DMA-co-AM)-196 系列聚合物溶液黏度高, 表明分子量的增加也可以提高聚合物溶液的黏度。

在恒剪切速率下, 随着温度的增加, 聚合物黏度下降均符合 Arrhenius 方程(公式 1)。随 AM 含量的增加, P(DMA-co-AM)-196 系列聚合物溶液在 60 °C 时的黏度比 25 °C 时分别下降了 55.6%、53.8%、52.5%(图 3(c)), 表明 AM 有助于形成更多的氢键相互作用, 可以提高聚合物溶液网络稳定性; 在 P(DMA-co-AM)-226 系列聚合物中, PDMA-226 黏度下降了 57.0%, P(DMA-co-AM_{0.02})-226 黏度下降了 50.8%, 表现出了更好的网络稳定性, 意味着氢键相互作用可以更好地抵抗环境温度的变化。

2.3 AM 含量对筛分性能的影响

质量浓度为 0.045 g/mL 的 P(DMA-co-AM_{0.02})-226 溶液进行毛细管电泳筛分 DNA 片段的内标图及电泳谱图如图 4(a) 所示。每个 DNA 片段及内标的峰高均大于 1500 相对荧光强度单位, 检测信号强且并未出现信号高于 50 相对荧光强度单位的渗透峰, 均符合 GB/T 37226—2018^[23] 技术要求。筛分介质在毛细管内筛分后通过纯水洗出, 用纯水(阴性样本)对 DNA 片段进行分析, 发现无信号峰且基线平稳, 表明聚合物溶液可以被彻底洗出, 易于更换毛细管筛分介质^[23]。

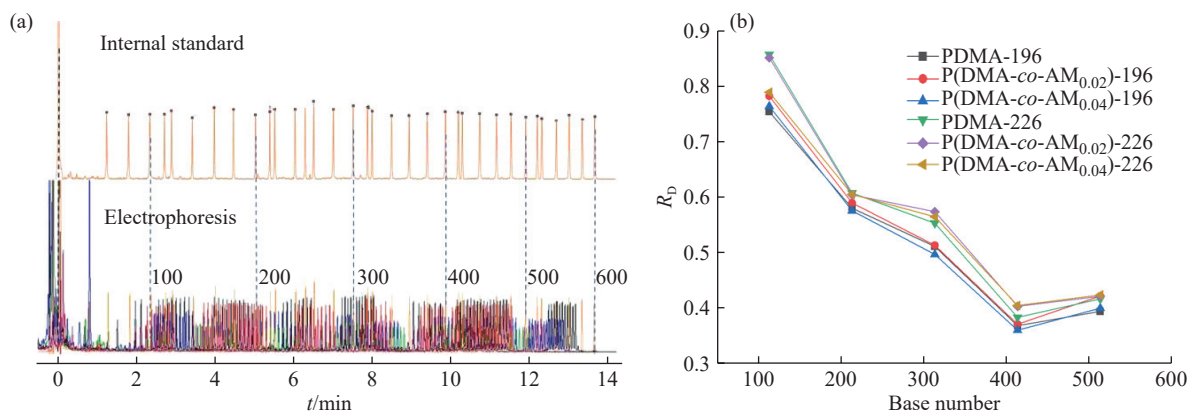


图 4 (a) 毛细管电泳 DNA 片段分离内标图及电泳谱图; (b) 筛分介质进行 DNA 片段分析的分度

Fig. 4 (a) Separation of DNA fragments by capillary electrophoresis with internal standard and electrophoresis; (b) Resolution of screening media for DNA fragment separation

DNA 片段在毛细管内迁移时, 片段越大, 迁移时间越长。然而迁移时间和 DNA 片段并不是理想的线性对应关系, 存在着一定程度的偏移, 可以通过线性回归系数 (R^2) 对迁移时间和 DNA 片段的关系进行表征。随着 DNA 片段增大, 筛分介质对其分离能力减弱, DNA 出峰间隔时间变短。本文中这 6 种筛分介质的 R^2 均大于 0.9995(表 3), 表明均可以对 DNA 片段样品进行精确分析^[23]。选择了 5 对碱基根据公式(3)计算 DNA 片段的分离度, 结果如图 4(b) 所示。P(DMA-co-AM)-226 系列比 P(DMA-co-AM)-196 系列分离度高, 其中

P(DMA-co-AM_{0.02})-226 分离度最高。前面流变学研究表明, AM 的加入以及共聚物分子量的增加有助于形成更稳定的筛分网络, 因此, 在分离 DNA 片段时, 增加对 DNA 大片段的分离度, 可提高聚合物筛分性能。

将聚合物溶液作为筛分介质, 在 16 通道毛细管阵列电泳仪中对 DNA 片段进行分析, DNA 片段的峰衰程度 ΔH 和迁移时间 t 及对应的相对标准偏差 (ΔH_{RSD} , t_{RSD}) 如表 3 所示。P(DMA-co-AM)-226 系列聚合物比 P(DMA-co-AM)-196 系列聚合物的峰衰程度略大, 但 ΔH 均高于 0.7, 表明筛分介质均可以很好地分析出所有的 DNA 片段^[24]。前面提到 P(DMA-co-AM)-226 系列整体比 P(DMA-co-AM)-196 系列分离度高。P(DMA-co-AM_{0.02})-226 在 P(DMA-co-AM)-226 系列中的迁移时间较短, 可以更快地分离出 DNA 片段。P(DMA-co-AM) 峰衰和迁移时间的相对标准偏差比均聚物的更小, 表明共聚物溶液分析的重现性更好。

表 3 筛分介质的峰衰程度和迁移时间及对应的相对标准偏差 (RSD, $n = 16$)

Table 3 Peak intensity attenuation and migration time of separation matrices and the corresponding relative standard deviation (RSD, $n = 16$)

Sample	ΔH	$\Delta H_{\text{RSD}}/\%$	t/min	$t_{\text{RSD}}/\%$	R^2
PDMA-196	0.748	3.00	12.32	18.91	0.9996
P(DMA-co-AM _{0.02})-196	0.758	0.78	12.82	4.27	0.9998
P(DMA-co-AM _{0.04})-196	0.710	0.50	14.34	7.20	0.9999
PDMA-226	0.717	0.79	13.33	8.70	0.9996
P(DMA-co-AM _{0.02})-226	0.718	0.64	12.97	8.42	0.9997
P(DMA-co-AM _{0.04})-226	0.715	0.25	13.12	8.50	0.9996

3 结 论

(1) 合成了不同分子量的 PDMA 及 P(DMA-co-AM), 随着 AM 含量的增加, 相应的 DNA 筛分聚合物溶液的黏度也增加, 表明 AM 结构单元有助于聚合物溶液中氢键的增强。

(2) 随着 AM 含量增加, 聚合物溶液的 n 值越大, DNA 筛分聚合物溶液剪切变稀行为越强, 有利于毛细管电泳分离介质自动进样; 与均聚物相比, P(DMA-co-AM_{0.02})-226 网络结构更加稳定, 可以更好地抵抗环境温度变化。

(3) AM 含量的增加可以提高对 DNA 大分子片段的分离度, 其中 P(DMA-co-AM_{0.02})-226 的分离度最高, 迁移时间较短, 可以更快地分离出 DNA 片段, 并且重现性良好。

参考文献:

- [1] WANG F, CONG H L, XING J, WANG S, SHEN Y Q, YU B. Novel antifouling polymer with self-cleaning efficiency as surface coating for protein analysis by electrophoresis [J]. *Talanta*, 2021, 221: 121493.
- [2] WU H M, TANG K Q. Highly sensitive and robust capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry: Interfaces, preconcentration techniques and applications [J]. *Reviews in Analytical Chemistry*, 2020, 39(1): 45-55.
- [3] SOGA T. Advances in capillary electrophoresis mass spectrometry for metabolomics [J]. *Trends in Analytical Chemistry*, 2023, 158: 116883.
- [4] ZHOU D, WANG Y M, YANG R M, ZHANG W L, SHI R S. Effects of novel quasi-interpenetrating network/gold nanoparticles composite matrices on DNA sequencing performances by CE [J]. *Electrophoresis*, 2007, 28(17): 2998-3007.
- [5] RANASINGHE M, QUIRINO J P. Can we replace liquid chromatography with the greener capillary electrophoresis? [J]. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 2021, 31: 100515.
- [6] 江凤浩, 洪瀚, 姜伯玮, 苏朝晖. 基于温敏性 *N, N*-二甲基丙烯酰胺/*N*-异丙基丙烯酰胺无规共聚物的毛细管无胶电泳筛分介质 [J]. *应用化学*, 2023, 40(9): 1312-1321.
JIANG F H, HONG H, JIANG B W, SU Z H. Thermoresponsive poly(*N, N*-dimethylacrylamide-co-*N*-isopropylacrylamide) for preparation of composite sieving media in non-gel capillary electrophoresis [J]. *Chinese Journal of Applied Chemistry*, 2023, 40(9):

- 1312-1321.
- [7] GOETZINGER W, KOTLER L, CARRILHO E, RUIZ-MARTINEZ M C, SALAS-SOLANO O, KARGER B L. Characterization of high molecular mass linear polyacrylamide powder prepared by emulsion polymerization as a replaceable polymer matrix for DNA sequencing by capillary electrophoresis [J]. *Electrophoresis*, 1998, 19(2): 242-248.
- [8] ALBARGHOUTH M N, BUCHHOLZ B A, DOHERTY E A S, BOGDAN F M, ZHOU H H, BARRON A E. Impact of polymer hydrophobicity on the properties and performance of DNA sequencing matrices for capillary electrophoresis [J]. *Electrophoresis*, 2001, 22(4): 737-747.
- [9] ZHANG J, HE W D, LIANG D H, FANG D F, CHU B, GASSMANN M. Designing polymer matrix for microchip-based double-stranded DNA capillary electrophoresis [J]. *Journal of Chromatography A*, 2006, 1117(2): 219-227.
- [10] WANG Y M, LIANG D H, YING O C, CHU B. Quasi-interpenetrating network formed by polyacrylamide and poly(*N,N*-dimethylacrylamide) used in high-performance DNA sequencing analysis by capillary electrophoresis [J]. *Electrophoresis*, 2005, 26(1): 126-136.
- [11] SONG W H, ZHOU D, PENG S H, WANG Y M. Effect of quasi-interpenetrating network of polyacrylamide and poly(*N,N*-dimethylacrylamide) on separation of dsDNA fragments and basic protein using CE [J]. *Journal of Separation Science*, 2009, 32(4): 671-680.
- [12] ZHOU D, WANG Y M, ZHANG W L, YANG R M, SHI R H. Novel quasi-interpenetrating network/gold nanoparticles composite matrices for DNA sequencing by CE [J]. *Electrophoresis*, 2007, 28(7): 1072-1080.
- [13] ZHANG J Y, TRAN N T, WEBER J, SLIM C, VIOVY J L, TAVERNA M. Poly(*N,N*-dimethylacrylamide)-grafted polyacrylamide: A self-coating copolymer for sieving separation of native proteins by CE [J]. *Electrophoresis*, 2006, 27(15): 3086-3092.
- [14] CHIARI M, MELIS A. Low viscosity DNA sieving matrices for capillary electrophoresis [J]. *Trends in Analytical Chemistry*, 1998, 17(10): 623-632.
- [15] AL HASHMI A R, AL MAAMARI R S, AL SHABIBI I S, MANSOOR A M, ZAITOUN A, AL SHARJI H H. Rheology and mechanical degradation of high-molecular-weight partially hydrolyzed polyacrylamide during flow through capillaries [J]. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, 2013, 105: 100-106.
- [16] 陈浩, 吴雨晨, 朱良宇, 苗贵兰, 龚昀晗, 王延梅. 基于线形聚丙烯酰胺聚合物溶液流变学行为的影响因素 [J]. *功能高分子学报*, 2024, 37(4): 304-311.
- CHEN H, WU Y C, ZHU L Y, MIAO G L, GONG Y H, WANG Y M. Study on the influencing factors of rheological behavior based on linear polyacrylamide polymer solution [J]. *Journal of Functional Polymers*, 2024, 37(4): 304-311.
- [17] 何平笙, 杨海洋, 朱平平, 翟保均. 高分子物理实验 [M]. 合肥: 中国科学技术大学出版社, 2002.
- HE P S, YANG H Y, ZHU P P, ZHAI B J. *Polymer Physics Experiment* [M]. Hefei: University of Science and Technology of China Press, 2002.
- [18] 周丹, 王延梅. 毛细管电泳无胶筛分介质分离 DNA 的机理 [J]. *化学进展*, 2006(Z2): 987-994.
- ZHOU D, WANG Y M. Mechanisms of DNA separation by capillary electrophoresis in non-gel sieving matrices [J]. *Progress in Chemistry*, 2006(Z2): 987-994.
- [19] LEWANDOWSKA K, SZULC M. Rheological and film-forming properties of chitosan composites [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(15): 8763.
- [20] 史铁钧, 吴德峰. 高分子流变学基础 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2006.
- SHI T J, WU D F. *Fundamentals of Polymer Rheology* [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2006.
- [21] BOULOS S, CABRICES O, BIAS M, MCCORD B R. Development of an entangled polymer solution for improved resolution in DNA typing by CE [J]. *Electrophoresis*, 2008, 29(23): 4695-4703.
- [22] HAMDI M, NASRI R, HAJJI S, NIGEN M, LI S M, NASRI M. Acetylation degree, a key parameter modulating chitosan rheological, thermal and film-forming properties [J]. *Food Hydrocolloids*, 2019, 87: 48-60.
- [23] 法庭科学人类荧光标记 STR 复合扩增检测试剂质量基本要求: GB/T 37226—2018[S]. 北京: 国家市场监督管理总局、中国国家标准化管理委员会, 2018.
- Criterion of forensic science human fluorescence STR multiplex amplification reagent: GB/T 37226—2018[S]. Beijing: State Administration for Market Regulation, Standardization Administration of the People's Republic of China, 2018.
- [24] 中华人民共和国国家计量技术规范遗传分析仪校准规范: JJF 1838—2020[S]. 北京: 中国标准出版社, 2020.
- Calibration Specification for Genetic Analyzers: JJF 1838—2020[S]. Beijing: Standards Press of China, 2020.

(责任编辑: 王吉晶)