



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1997678 B

(45) 授权公告日 2011.10.26

(21) 申请号 200480027066.4

C08F 20/56 (2006.01)

(22) 申请日 2004.09.16

C08L 33/24 (2006.01)

C08L 33/26 (2006.01)

(30) 优先权数据

10/665,730 2003.09.19 US

10/671,335 2003.09.25 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2006.03.20

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2004/030068 2004.09.16

(87) PCT申请的公布数据

W02005/032686 EN 2005.04.14

(73) 专利权人 纽约州州立大学研究基金会

地址 美国纽约州

(72) 发明人 朱鹏年 宋立国 方渡飞 梁德海

刘天波 王延梅 应琦琮

(74) 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限

责任公司 11240

代理人 章社杲

(51) Int. Cl.

C08F 120/56 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 1046979 A, 1990.11.14, 全文.

CN 1340552 A, 2002.03.20, 全文.

WO 0224313 A2, 2002.03.28, 说明书第3页
第19行至第23行, 说明书第12页第9行至18行,
说明书第15页第21行, 实施例1.

审查员 周芳宇

权利要求书 7 页 说明书 19 页 附图 27 页

(54) 发明名称

用作分离介质的类互穿网络

(57) 摘要

本发明涉及一种聚合物链的类互穿网络, 该聚合物链包括以主要骨架形式存在的线性聚丙烯酰胺 (LPA) 链和聚二甲基丙烯酰胺 (PDMA) 链。该 LPA 链的重均分子量大约是 0.05×10^6 到大约 $25 \times 10^6 \text{ g/mol}$, 旋转半径大约是 10nm 到 350nm; PDMA 链是在 LPA 主要骨架存在时通过聚合 PDMA 制备得到。其中, 该 LPA 和 PDMA 链彼此缠结、互穿; 并且, 其中, 该类互穿网络基本无化学交联。

1. 一种聚合物链的类互穿网络,所述聚合物链包括:

(a) 以主要骨架形式存在的线性聚丙烯酰胺链,所述聚丙烯酰胺链的重均分子量为 0.05×10^6 到 25×10^6 g/mol, 旋转半径为 10nm 到 350nm ;以及

(b) 聚二甲基丙烯酰胺链,所述聚二甲基丙烯酰胺链是在线性聚丙烯酰胺主要骨架存在下,通过聚合二甲基丙烯酰胺制备,

其中,所述线性聚丙烯酰胺链和聚二甲基丙烯酰胺链彼此缠结、互穿,并且其中,所述类互穿网络无化学交联。

2. 根据权利要求 1 所述的网络,其中,线性聚丙烯酰胺主要骨架是通过反相微乳液聚合形成。

3. 根据权利要求 1 所述的网络,其中,所述聚二甲基丙烯酰胺是在线性聚丙烯酰胺主要骨架中通过自由基聚合而聚合形成。

4. 根据权利要求 1 所述的网络,其中,所述线性聚丙烯酰胺主要骨架包括缓冲溶液中的线性聚丙烯酰胺,其中,所述线性聚丙烯酰胺具有交叠浓度为 5×10^{-4} 到 4.0×10^{-2} g/ml。

5. 根据权利要求 1 所述的网络,其中,所述线性聚丙烯酰胺主要骨架在缓冲溶液中的交叠浓度为 1.2×10^{-3} g/ml。

6. 根据权利要求 1 所述的网络,其中,所述线性聚丙烯酰胺的重均分子量的下限为 0.05×10^6 g/mol。

7. 根据权利要求 1 所述的网络,其中,所述线性聚丙烯酰胺的重均分子量的下限为 0.1×10^6 g/mol。

8. 根据权利要求 1 所述的网络,其中,所述线性聚丙烯酰胺的重均分子量的下限为 0.3×10^6 g/mol。

9. 根据权利要求 1 所述的网络,其中,所述线性聚丙烯酰胺的重均分子量的下限为 1×10^6 g/mol。

10. 根据权利要求 1 所述的网络,其中,所述线性聚丙烯酰胺的重均分子量的下限为 4×10^6 g/mol。

11. 根据权利要求 1 所述的网络,其中,所述线性聚丙烯酰胺的重均分子量的下限为 6×10^6 g/mol。

12. 根据权利要求 1 所述的网络,其中,所述线性聚丙烯酰胺的重均分子量的下限为 7×10^6 g/mol。

13. 根据权利要求 1 所述的网络,其中,所述线性聚丙烯酰胺的重均分子量范围的上限为 8×10^6 g/mol。

14. 根据权利要求 1 所述的网络,其中,所述线性聚丙烯酰胺的重均分子量范围的上限为 10×10^6 g/mol。

15. 根据权利要求 1 所述的网络,其中,所述线性聚丙烯酰胺的重均分子量范围的上限为 15×10^6 g/mol。

16. 根据权利要求 1 所述的网络,其中,所述线性聚丙烯酰胺的重均分子量范围的上限为 25×10^6 g/mol。

17. 根据权利要求 1 所述的网络,其中,所述线性聚丙烯酰胺的旋转半径范围的下限为

10nm。

18. 根据权利要求 1 所述的网络,其中,所述线性聚丙烯酰胺的旋转半径范围的下限为 15nm。

19. 根据权利要求 1 所述的网络,其中,所述线性聚丙烯酰胺的旋转半径范围的下限为 28nm。

20. 根据权利要求 1 所述的网络,其中,所述线性聚丙烯酰胺的旋转半径范围的下限为 55nm。

21. 根据权利要求 1 所述的网络,其中,所述线性聚丙烯酰胺的旋转半径范围的下限为 125nm。

22. 根据权利要求 1 所述的网络,其中,所述线性聚丙烯酰胺的旋转半径范围的下限为 150nm。

23. 根据权利要求 1 所述的网络,其中,所述线性聚丙烯酰胺的旋转半径范围的下限为 165nm。

24. 根据权利要求 1 所述的网络,其中,所述线性聚丙烯酰胺的旋转半径范围的上限为 180nm。

25. 根据权利要求 1 所述的网络,其中,所述线性聚丙烯酰胺的旋转半径范围的上限为 210nm。

26. 根据权利要求 1 所述的网络,其中,所述线性聚丙烯酰胺的旋转半径范围的上限为 250nm。

27. 根据权利要求 1 所述的网络,其中,所述线性聚丙烯酰胺的旋转半径范围的上限为 350nm。

28. 根据权利要求 1 所述的网络,其中,所述线性聚丙烯酰胺的多分散指数为 1.01 到 1.8。

29. 根据权利要求 28 所述的网络,其中,所述线性聚丙烯酰胺的多分散指数范围的下限为 1.01、。

30. 根据权利要求 28 所述的网络,其中,所述线性聚丙烯酰胺的多分散指数范围的下限为 1.02。

31. 根据权利要求 28 所述的网络,其中,所述线性聚丙烯酰胺的多分散指数范围的下限为 1.05。

32. 根据权利要求 28 所述的网络,其中,所述线性聚丙烯酰胺的多分散指数范围的下限为 1.1。

33. 根据权利要求 28 所述的网络,其中,所述线性聚丙烯酰胺的多分散指数范围的上限为 1.3。

34. 根据权利要求 28 所述的网络,其中,所述线性聚丙烯酰胺的多分散指数范围的上限为 1.5。

35. 根据权利要求 28 所述的网络,其中,所述线性聚丙烯酰胺的多分散指数范围的上限为 1.6。

36. 根据权利要求 28 所述的网络,其中,所述线性聚丙烯酰胺的多分散指数范围的上限为 1.8。

37. 一种缠结的聚合物链的类互穿网络,其中所述聚合物链包括:

(a) 线性聚丙烯酰胺链;和

(b) 缠结在所述线性聚丙烯酰胺链内并互穿在线性聚丙烯酰胺链中的聚二甲基丙烯酰胺链,

其中,所述线性聚丙烯酰胺和聚二甲基丙烯酰胺的重均分子量为 $0.1 \times 10^6 \text{g/mol}$ 到 $20 \times 10^6 \text{g/mol}$, 旋转半径为 15nm 到 320nm, 其中所述类互穿网络无化学交联。

38. 根据权利要求 37 所述的网络,其中,所述重均分子量范围的下限为 $0.1 \times 10^6 \text{g/mol}$ 。

39. 根据权利要求 37 所述的网络,其中,所述重均分子量范围的下限为 $0.5 \times 10^6 \text{g/mol}$ 。

40. 根据权利要求 37 所述的网络,其中,所述重均分子量范围的下限为 $2 \times 10^6 \text{g/mol}$ 。

41. 根据权利要求 37 所述的网络,其中,所述重均分子量范围的下限为 $6 \times 10^6 \text{g/mol}$ 。

42. 根据权利要求 37 所述的网络,其中,所述重均分子量范围的上限为 $7 \times 10^6 \text{g/mol}$ 。

43. 根据权利要求 37 所述的网络,其中,所述重均分子量范围的上限为 $10 \times 10^6 \text{g/mol}$ 。

44. 根据权利要求 37 所述的网络,其中,所述重均分子量范围的上限为 $16 \times 10^6 \text{g/mol}$ 。

45. 根据权利要求 37 所述的网络,其中,所述重均分子量范围的上限为 $20 \times 10^6 \text{g/mol}$ 。

46. 根据权利要求 37 所述的网络,其中,所述旋转半径范围的下限为 15nm。

47. 根据权利要求 37 所述的网络,其中,所述旋转半径范围的下限为 40nm。

48. 根据权利要求 37 所述的网络,其中,所述旋转半径范围的下限为 80nm。

49. 根据权利要求 37 所述的网络,其中,所述旋转半径范围的下限为 150nm。

50. 根据权利要求 37 所述的网络,其中,所述旋转半径范围的上限为 165nm。

51. 根据权利要求 37 所述的网络,其中,所述旋转半径范围的上限为 210nm。

52. 根据权利要求 37 所述的网络,其中,所述旋转半径范围的上限为 280nm。

53. 根据权利要求 37 所述的网络,其中,所述旋转半径范围的上限为 320nm。

54. 根据权利要求 37 所述的网络,其中,所述线性聚丙烯酰胺和聚二甲基丙烯酰胺的多分散指数均为 1.0 到 1.8。

55. 根据权利要求 37 所述的网络,其中,所述线性聚丙烯酰胺和聚二甲基丙烯酰胺的多分散指数均为 1.6。

56. 根据权利要求 37 所述的网络,其中,所述网络在缓冲溶液中的交叠浓度为 5.0×10^{-4} 到 $3.0 \times 10^{-2} \text{g/ml}$ 。

57. 一种缠结的聚合物链的类互穿网络,由下述方法制备得到,所述方法包括:

(a) 提供一种包括线性聚丙烯酰胺和缓冲剂的溶液,其中,所述线性聚丙烯酰胺的重均分子量为 0.05×10^6 到 $25 \times 10^6 \text{g/mol}$;

(b) 提供一种包括聚二甲基丙烯酰胺和缓冲剂的溶液,其中,所述聚二甲基丙烯酰胺的重均分子量为 100000 到 $25 \times 10^6 \text{g/mol}$;

(c) 以分步方式将线性聚丙烯酰胺 / 缓冲剂溶液和聚二甲基丙烯酰胺 / 缓冲剂溶液混合,其中,所述线性聚丙烯酰胺 / 缓冲剂溶液的浓度是聚二甲基丙烯酰胺 / 缓冲剂溶液浓度的 1 到 15 倍,所述线性聚丙烯酰胺 / 缓冲剂溶液的体积是聚二甲基丙烯酰胺溶液体积的 1 到 50 倍;其中,制备得到由缠结、互穿的线性聚丙烯酰胺和聚二甲基丙烯酰胺聚合物链构

成的类互穿网络,其中,所述互穿网络无化学交联。

58. 根据权利要求 57 所述的类互穿网络,其中,所述线性聚丙烯酰胺的重均分子量范围的下限为 $0.05 \times 10^6 \text{g/mol}$ 。

59. 根据权利要求 57 所述的类互穿网络,其中,所述线性聚丙烯酰胺的重均分子量范围的下限为 $0.1 \times 10^6 \text{g/mol}$ 。

60. 根据权利要求 57 所述的类互穿网络,其中,所述线性聚丙烯酰胺的重均分子量范围的下限为 $0.3 \times 10^6 \text{g/mol}$ 。

61. 根据权利要求 57 所述的类互穿网络,其中,所述线性聚丙烯酰胺的重均分子量范围的下限为 $1 \times 10^6 \text{g/mol}$ 。

62. 根据权利要求 57 所述的类互穿网络,其中,所述线性聚丙烯酰胺的重均分子量范围的上限为 $4 \times 10^6 \text{g/mol}$ 。

63. 根据权利要求 57 所述的类互穿网络,其中,所述线性聚丙烯酰胺的重均分子量范围的上限为 $6 \times 10^6 \text{g/mol}$ 。

64. 根据权利要求 57 所述的类互穿网络,其中,所述线性聚丙烯酰胺的重均分子量范围的上限为 $7 \times 10^6 \text{g/mol}$ 。

65. 根据权利要求 57 所述的类互穿网络,其中,所述线性聚丙烯酰胺的重均分子量范围的上限为 $8 \times 10^6 \text{g/mol}$ 。

66. 根据权利要求 57 所述的类互穿网络,其中,所述线性聚丙烯酰胺的重均分子量范围的上限为 $10 \times 10^6 \text{g/mol}$ 。

67. 根据权利要求 57 所述的类互穿网络,其中,所述线性聚丙烯酰胺的重均分子量范围的上限为 $15 \times 10^6 \text{g/mol}$ 。

68. 根据权利要求 57 所述的类互穿网络,其中,所述线性聚丙烯酰胺的重均分子量范围的上限为 $20 \times 10^6 \text{g/mol}$ 。

69. 根据权利要求 57 所述的类互穿网络,其中,所述聚二甲基丙烯酰胺的重均分子量范围的下限为 100000g/mol 。

70. 根据权利要求 57 所述的类互穿网络,其中,所述聚二甲基丙烯酰胺的重均分子量范围的下限为 300000g/mol 。

71. 根据权利要求 57 所述的类互穿网络,其中,所述聚二甲基丙烯酰胺的重均分子量范围的下限为 500000g/mol 。

72. 根据权利要求 57 所述的类互穿网络,其中,所述聚二甲基丙烯酰胺的重均分子量范围的上限为 $1 \times 10^6 \text{g/mol}$ 。

73. 根据权利要求 57 所述的类互穿网络,其中,所述聚二甲基丙烯酰胺的重均分子量范围的上限为 $3 \times 10^6 \text{g/mol}$ 。

74. 根据权利要求 57 所述的类互穿网络,其中,所述聚二甲基丙烯酰胺的重均分子量范围的上限为 $10 \times 10^6 \text{g/mol}$ 。

75. 根据权利要求 57 所述的类互穿网络,其中,所述聚二甲基丙烯酰胺的重均分子量范围的上限为 $25 \times 10^6 \text{g/mol}$ 。

76. 根据权利要求 57 所述的类互穿网络,其中,所述线性聚丙烯酰胺/缓冲剂溶液的浓度为 1.0 到 12.0% g/ml。

77. 根据权利要求 57 所述的类互穿网络,其中,所述聚二甲基丙烯酰胺 / 缓冲剂溶液的浓度为 0.1 到 3.0% g/ml。

78. 一种分离带电分子类物质的方法,所述方法包括:在外加电场的作用下,使带电分子类物质在分离介质中发生迁移,其中,对所述分离介质的改进包括:线性聚丙烯酰胺聚合物体系和聚二甲基丙烯酰胺聚合物体系,其中所述的聚合物体系形成根据权利要求 1 至 56 中任一项所述的类互穿网络。

79. 根据权利要求 78 所述的方法,其中,所述互穿网络是通过合成线性聚丙烯酰胺主要骨架、以及在所述主要骨架内聚合二甲基丙烯酰胺制备得到。

80. 根据权利要求 78 所述的方法,其中,制备所述互穿网络是通过:

(a) 提供一种包括线性聚丙烯酰胺和缓冲剂的溶液,其中,所述线性聚丙烯酰胺的重均分子量为 0.05×10^6 到 25×10^6 g/mol;

(b) 提供一种包括聚二甲基丙烯酰胺和缓冲剂的溶液,其中,所述聚二甲基丙烯酰胺的重均分子量为 100000 到 25×10^6 g/mol;以及

(c) 以分步方式将线性聚丙烯酰胺 / 缓冲剂溶液和聚二甲基丙烯酰胺 / 缓冲剂溶液进行混合,其中,所述线性聚丙烯酰胺 / 缓冲剂溶液的浓度是聚二甲基丙烯酰胺 / 缓冲剂溶液浓度的 1 到 15 倍,所述线性聚丙烯酰胺 / 缓冲剂溶液的体积是聚二甲基丙烯酰胺溶液体积的 1 到 50 倍。

81. 一种聚合物链的类互穿网络,所述聚合物链包括:

(a) 以主要骨架形式存在的丙烯酰胺 / 二甲基丙烯酰胺无规共聚物链,其中所述无规共聚物链的重均分子量为 0.05×10^6 到 2×10^6 g/mol,旋转半径为 10nm 到 80nm;以及

(b) 聚二甲基丙烯酰胺链,其中所述聚二甲基丙烯酰胺链是在无规共聚物主要骨架存在下,通过聚合二甲基丙烯酰胺制备得到的;

其中,所述丙烯酰胺 / 二甲基丙烯酰胺链和聚二甲基丙烯酰胺链彼此缠结,彼此互穿,并且其中所述类互穿网络无化学交联。

82. 根据权利要求 81 所述的网络,其中,无规共聚物主要骨架是通过自由基聚合形成的。

83. 根据权利要求 81 所述的网络,其中,所述聚二甲基丙烯酰胺是在无规共聚物主要骨架内,通过自由基聚合而聚合得到。

84. 根据权利要求 81 所述的网络,其中,所述无规共聚物主要骨架包括缓冲溶液中的共聚物,其中所述无规共聚物的交叠浓度为 3×10^{-3} 到 4.0×10^{-2} g/ml。

85. 根据权利要求 81 所述的网络,其中,所述共聚物主要骨架在缓冲溶液中的交叠浓度为 1×10^{-2} g/ml。

86. 根据权利要求 81 所述的网络,其中,所述无规共聚物的重均分子量范围的下限为 0.05×10^6 g/mol。

87. 根据权利要求 81 所述的网络,其中,所述无规共聚物的重均分子量范围的下限为 0.1×10^6 g/mol。

88. 根据权利要求 81 所述的网络,其中,所述无规共聚物的重均分子量范围的下限为 0.3×10^6 g/mol。

89. 根据权利要求 81 所述的网络,其中,所述的无规共聚物的重均分子量范围的上限

为 $0.5 \times 10^6 \text{g/mol}$ 。

90. 根据权利要求 81 所述的网络,其中,所述的无规共聚物的重均分子量范围的上限为 $1 \times 10^6 \text{g/mol}$ 。

91. 根据权利要求 81 所述的网络,其中,所述的无规共聚物的重均分子量范围的上限为 $2 \times 10^6 \text{g/mol}$ 。

92. 根据权利要求 81 所述的网络,其中,所述共聚物的旋转半径范围的下限为 10nm。

93. 根据权利要求 81 所述的网络,其中,所述共聚物的旋转半径范围的下限为 15nm。

94. 根据权利要求 81 所述的网络,其中,所述共聚物的旋转半径范围的下限为 30nm。

95. 根据权利要求 81 所述的网络,其中,所述共聚物的旋转半径范围的上限为 40nm。

96. 根据权利要求 81 所述的网络,其中,所述共聚物的旋转半径范围的上限为 55nm。

97. 根据权利要求 81 所述的网络,其中,所述共聚物的旋转半径范围的上限为 80nm。

98. 根据权利要求 81 所述的网络,其中,所述无规共聚物的多分散指数为 1.1 到 2.0。

99. 一种缠结的聚合物链的类互穿网络,所述类互穿网络由下述方法制备得到,所述方法包括:

(a) 提供一种包括丙烯酰胺 / 二甲基丙烯酰胺无规共聚物和缓冲剂的溶液,其中,所述丙烯酰胺 / 二甲基丙烯酰胺无规共聚物的重均分子量为 0.05×10^6 到 $2 \times 10^6 \text{g/mol}$;

(b) 提供一种包括聚二甲基丙烯酰胺和缓冲剂的溶液,其中,所述聚二甲基丙烯酰胺的重均分子量为 0.05×10^6 到 $25 \times 10^6 \text{g/mol}$;

(c) 以分步方式将共聚物 / 缓冲剂溶液和聚二甲基丙烯酰胺 / 缓冲剂溶液进行混合,其中,所述共聚物 / 缓冲剂溶液的浓度是聚二甲基丙烯酰胺 / 缓冲剂溶液浓度的 1 到 50 倍,所述共聚物 / 缓冲剂溶液的体积是聚二甲基丙烯酰胺 / 缓冲剂溶液体积的 1 到 20 倍;

其中,制备得到缠结的共聚物链和聚二甲基丙烯酰胺聚合物链的类互穿网络,其中,所述类互穿网络无化学交联。

100. 根据权利要求 99 所述的类互穿网络,其中,所述共聚物的重均分子量范围的下限为 $0.05 \times 10^6 \text{g/mol}$ 。

101. 根据权利要求 99 所述的类互穿网络,其中,所述共聚物的重均分子量范围的下限为 $0.1 \times 10^6 \text{g/mol}$ 。

102. 根据权利要求 99 所述的类互穿网络,其中,所述共聚物的重均分子量范围的下限为 $0.3 \times 10^6 \text{g/mol}$ 。

103. 根据权利要求 99 所述的类互穿网络,其中,所述共聚物的重均分子量范围的上限为 $0.5 \times 10^6 \text{g/mol}$ 。

104. 根据权利要求 99 所述的类互穿网络,其中,所述共聚物的重均分子量范围的上限为 $1 \times 10^6 \text{g/mol}$ 。

105. 根据权利要求 99 所述的类互穿网络,其中,所述共聚物的重均分子量范围的上限为 $1.5 \times 10^6 \text{g/mol}$ 。

106. 根据权利要求 99 所述的类互穿网络,其中,所述共聚物的重均分子量范围的上限为 $2 \times 10^6 \text{g/mol}$ 。

107. 根据权利要求 99 所述的类互穿网络,其中,所述聚二甲基丙烯酰胺的重均分子量范围的下限为 50000g/mol 。

108. 根据权利要求 99 所述的类互穿网络,其中,所述聚二甲基丙烯酰胺的重均分子量范围的下限为 100000g/mol 。

109. 根据权利要求 99 所述的类互穿网络,其中,所述聚二甲基丙烯酰胺的重均分子量范围的下限为 200000g/mol 。

110. 根据权利要求 99 所述的类互穿网络,其中,所述聚二甲基丙烯酰胺的重均分子量范围的上限为 500000g/mol 。

111. 根据权利要求 99 所述的类互穿网络,其中,所述聚二甲基丙烯酰胺的重均分子量范围的上限为 $1 \times 10^6\text{g/mol}$ 。

112. 根据权利要求 99 所述的类互穿网络,其中,所述聚二甲基丙烯酰胺的重均分子量范围的上限为 $3 \times 10^6\text{g/mol}$ 。

113. 根据权利要求 99 所述的类互穿网络,其中,所述聚二甲基丙烯酰胺的重均分子量范围的上限为 $5 \times 10^6\text{g/mol}$ 。

114. 根据权利要求 99 所述的类互穿网络,其中,所述聚二甲基丙烯酰胺的重均分子量范围的上限为 $10 \times 10^6\text{g/mol}$ 。

115. 根据权利要求 99 所述的类互穿网络,其中,所述聚二甲基丙烯酰胺的重均分子量范围的上限为 $25 \times 10^6\text{g/mol}$ 。

116. 根据权利要求 99 所述的类互穿网络,其中,所述共聚物 / 缓冲剂溶液的浓度为 5.0 到 20.0% g/ml。

117. 根据权利要求 99 所述的类互穿网络,其中,所述聚二甲基丙烯酰胺 / 缓冲剂溶液的浓度为 0.1 到 1.0% g/ml。

118. 一种分离带电分子类物质的方法,所述的方法包括:在外加电场的影响下,使带电分子类物质在分离介质中发生迁移,其中对所述分离介质的改进包括:丙烯酰胺 / 二甲基丙烯酰胺无规共聚物和聚二甲基丙烯酰胺聚合物,其中,所述聚合物体系形成根据权利要求 81 至 98 中任一项所述的类互穿网络。

119. 根据权利要求 118 所述的方法,其中,所述的互穿网络是通过合成丙烯酰胺 / 二甲基丙烯酰胺无规共聚物主要骨架,和在所述主要骨架内聚合二甲基丙烯酰胺制备得到。

120. 根据权利要求 118 所述的方法,其中,制备所述的互穿网络是通过:

(a) 提供一种包括丙烯酰胺 / 二甲基丙烯酰胺无规共聚物和缓冲剂的溶液,其中,丙烯酰胺 / 二甲基丙烯酰胺无规共聚物的重均分子量为 0.05×10^6 到 $2 \times 10^6\text{g/mol}$;

(b) 提供一种包括聚二甲基丙烯酰胺和缓冲剂的溶液,其中,聚二甲基丙烯酰胺的重均分子量为 50,000 到 $25 \times 10^6\text{g/mol}$;以及

(c) 以分步形式将共聚物 / 缓冲剂溶液和聚二甲基丙烯酰胺 / 缓冲剂溶液进行混合,其中所述共聚物 / 缓冲剂溶液的浓度是聚二甲基丙烯酰胺 / 缓冲剂溶液浓度的 1 到 50 倍,所述共聚物 / 缓冲剂溶液的体积是聚二甲基丙烯酰胺溶液体积的 1 到 20 倍;

其中,制备得到缠结的共聚物和聚二甲基丙烯酰胺聚合物链的类互穿网络,其中,所述类互穿网络无化学交联。

用作分离介质的类互穿网络

[0001] 本发明在国家人类基因组研究学会基金 No. 5R01HG01386-07-8 的政府支持下完成。政府享有本发明的某些权利。

技术领域

[0002] 本发明总体涉及分离带电分子类物质的技术领域,尤其涉及用于毛细管电泳的分离介质。

背景技术

[0003] 在生物学相关科学中,凝胶电泳是一种使用最为广泛的分离技术。在外加电场的作用下,通过使带电分子类物质,如蛋白质、肽类、核酸和寡核苷酸,在缓冲介质中发生迁移将它们分离开。通常,将缓冲介质与一种低到中等浓度的适合的凝胶剂一起使用,以促进分离,并且将被分离物质发生混合的机率降低到最小。

[0004] 直到最近,电泳分离才在凝胶板或者开放式凝胶床上进行,其通常是由琼脂糖或交联的聚丙烯酰胺材料构成。近来,使用聚合物凝胶或溶液作为分离介质的毛细管电泳(CE)已被用于带电分子如DNA的分离。毛细管电泳技术和光度检测方法的联合使用为带电分子的自动化操作以及快速定量分析提供了可能性。而且,相对于传统的平板电泳方法,毛细管电泳能在使用很少量的样品、凝胶(或聚合物溶液)和缓冲剂的情况下提供样品的定量信息。并且,已实现了对带有不同有效电荷的带电大分子的高分辨率分离。

[0005] 通常,毛细管电泳所用的毛细管柱是由熔融石英管制备得到的,其直径大约在25 μm 到200 μm 之间,长度为大约30cm到大约200cm。毛细管柱内充满了凝胶或溶液分离介质和缓冲剂。电泳技术被用于分离带电分子类物质。

[0006] 在CE中,分离介质是最重要的参数之一,因为它决定带电分子类物质(如DNA片段)的迁移特征,包括分辨率。目前,聚合物溶液被广泛用于这样的分离介质。

[0007] 已经开发了几种合成的亲水均聚物,同时作为DNA分离介质已进行了验证。这些均聚物包括:线性聚丙烯酰胺(LPA);和烷基取代的衍生物,如聚-N,N-二甲基丙烯酰胺(PDMA)、聚-N-丙烯酰基氨基-乙氧基乙醇(PAAEE)、聚丙烯酰基氨基丙醇(PAAP)、聚(丙烯酰基氨基乙氧基)乙基吡喃葡萄糖苷(PAEG)、聚乙二醇(PEG)、和聚环氧乙烷(PEO)。

[0008] 电泳界非常认同:高度缠结的LPA溶液通常能提供最佳的测序(sequencing)分离,能分离长达1300个碱基的片段中只有一个碱基不同的DNA分子(Zhou et al., Anal. Chem. 72 : 1045-52(2000))。认为LPA良好的性能部分是由于它的亲水性。

[0009] 尽管LPA为长读测序(long read sequencing)能提供良好的DNA分离,但是它要求使用稳定毛细管壁涂层的缺点。该毛细管壁涂层要求能抑制电渗流(electro-osmotic flow)(EOF),并防止被分析物的吸收。电渗流的产生是由于分离介质不能直接同毛细管内壁连接。在分离过程中施加电场,这个问题严重的电渗流就会出现。通过将可溶缓冲离子吸附到毛细管壁的带电表面可形成双电层。毛细管壁附近的溶液中,离子局部浓度过大,这将导致在邻近毛细管壁的部位保持电荷中性。最终结果是:在电泳过程中,在带电通道壁会

形成液体的整体流动。电渗流导致令人极不满意的分离结果。

[0010] 旨在防止 EOF 产生的传统方法包括导入化合物,在将分离介质注入毛细管之前,该化合物能结合到毛细管壁的内表面上。如授予 Shieh 的美国专利 No. 5,447,617 描述了将聚丁二烯共价结合到毛细管的内表面上,在其中引入丙烯酰胺单体,并将丙烯酰胺和聚丁二烯共聚。这种预涂层技术不仅增加成本,还产生如下问题:如毛细管积垢、涂层不均一、以及被涂布的毛细管的有限贮藏期限。

[0011] 为避免 EOF 问题的发生,亲水性较低的聚合物被作为分离介质使用。比如:聚(乙烯基吡咯烷酮)(PVP)已作为 DNA 测序基质使用。由于 PVP 能动态涂布毛细管壁,避免了对预涂布毛细管壁的需求。但是,和使用 LPA 获得的分离效能相比,PVP 的分离效能差的多。使用 PVP 仅能实现略大于 300 个连续 DNA 碱基的分离。PVP 的限制性特征在于:分离期间所用的筛选基质和荧光染料之间的非特异性(疏水性)相互作用过高。这种相互作用使较大 DNA 片段的分离不清楚。

[0012] 高性能分离介质(其筛选能力高、粘度低,并具有动态涂布能力)的开发将有助于 CE 的自动化,进一步提高其性能。但是,具有这些特性的均聚物迄今为止还没有发现。因此,不同的均聚物的混合物得以研究。

[0013] 研究发现:分子量不同的同一聚合物(如 PEO,六乙基纤维素(HEC)和 LPA)的混合物,以及两种改性多糖的混合物,如琼脂糖和 HEC,对于 DNA 小片段和 DNA 大片段都具有较高的分辨率。但是,由化学结构完全不同的两种聚合物混合得到的混合物,从来没有得到成功应用。Kim 等人(Kim, Y., Yeung, E. S., J. Chromatogr. A., 1997, 781, 315-325)曾尝试使用 PEO 和六丙基纤维素(HPC)的混合物来进行 DNA 测序,但发现分离效果非常差。失败的原因在于两种聚合物的不相容性。

[0014] CE 的另外一个挑战在于:将通常非常粘稠的分离基质导入到狭窄的毛细管中。聚丙烯酰胺在毛细管中聚合,避免了迫使聚合物溶液进入毛细管或者微通道的问题。还希望在每次使用后,将“使用过的”聚合物基质从毛细管中除去,并重新在毛细管内填充新鲜基质。但是,一旦聚丙烯酰胺在毛细管中聚合,聚合后的凝胶很难从毛细管中除去。

[0015] 最近,具有粘度依赖特征的共聚物被应用。这种共聚物允许低粘度状态下介质的加载和去除,以及高粘度状态下的电泳分离。如:基于具有低摩尔量(N-异丙基丙烯酰胺)的短的接枝物的 LPA 的亲水骨架的基质已被描述(Sudor et al. Electrophoresis 22: 720-8 (2001))。并且,基于 N,N-二甲基丙烯酰胺和 N,N-二乙基丙烯酰胺的共聚物(“P(DMA/DEA)”)的基质也被检测(Buchholz et al. Anal. Chem. 73: 157-64. (2001))。但是,共聚物的合成难以控制和重复,会产生不可靠的结果。

[0016] 成功的电泳用分离介质将包括如下特征:稳定、中性、合适的网孔大小、动态涂布能力(以有效抑制电渗)、低粘度,介质材料用量最少、同时能提供良好的分离结果和长的读长(read length)。在本发明之前,能够提供一些所需特性(如长的读长)的介质,一般不同时具备其它的所需特性,如动态涂布能力。

发明内容

[0017] 在一具体实施例中,本发明提供了一种聚合物链的类互穿网络(类-IPN),该聚合物链包括:以主要骨架形式存在的线性聚丙烯酰胺(LPA)链,以及聚二甲基丙烯酰胺

(PDMA) 链, LPA 链的重均分子量是大约 0.05×10^6 到大约 $25 \times 10^6 \text{g/mol}$, 旋转半径大约是 10nm 到 350nm; 而聚二甲基丙烯酰胺 (PDMA) 链是在主要骨架 LPA 存在时, 通过聚合 PDMA 制备得到的。其中, LPA 链和 PDMA 链彼此缠结、互穿; 并且其中, 该类 -IPN 基本无化学交联。

[0018] 在另一具体实施例中, 本发明提供了缠结的聚合物链的类互穿网络, 该聚合物链包括线性聚丙烯酰胺 (LPA) 链和聚二甲基丙烯酰胺 (PDMA) 链, 该 PDMA 链缠结在 LPA 链间, 并与 LPA 链互穿, 其中 LPA 和 PDMA 的重均分子量大约是 0.1×10^6 到大约 $20 \times 10^6 \text{g/mol}$, 而旋转半径大约是 15nm 到 320nm, 其中该类 -IPN 基本没有化学交联。

[0019] 在另一具体实施例中, 本发明提供了缠结的聚合物链的类互穿网络, 其由下述方法制备得到。该方法包括: 提供包括线性聚丙烯酰胺 (LPA) 和缓冲剂的溶液, 其中该 LPA 重均分子量为 0.05×10^6 到 $25 \times 10^6 \text{g/mol}$; 提供包括聚二甲基丙烯酰胺 (PDMA) 和缓冲剂的溶液, 其中该 PDMA 的重均分子量为 100,000 到 $25 \times 10^6 \text{g/mol}$; 以分步方式将 LPA/ 缓冲剂的溶液与 PDMA/ 缓冲剂的溶液进行混合, 其中 LPA/ 缓冲剂溶液的浓度是 PDMA/ 缓冲剂溶液浓度的 1 到 15 倍, 而 LPA/ 缓冲剂溶液的体积大约是 PDMA/ 缓冲剂溶液体积的 1 到 50 倍; 其中, 制备得到缠结、互穿的 LPA 和 PDMA 聚合物链的类互穿网络, 其中, 类 -IPN 基本无化学交联。

[0020] 在另一具体实施例中, 本发明提供了分离带电分子类物质的方法。该方法包括在外加电场的影响下, 使带电分子类物质在分离介质中发生迁移, 其中分离介质的改进包括: LPA 聚合物体系和 PDMA 聚合物体系, 其中该聚合体体系形成类互穿网络。

[0021] 在另一具体实施例中, 本发明提供了一种聚合物链的类互穿网络, 该聚合物链包括以主要骨架形式存在的丙烯酰胺 (AM)/ 二甲基丙烯酰胺 (DMA) 无规共聚物链, 其重均分子量是大约 0.05×10^6 到大约 $2 \times 10^6 \text{g/mol}$, 旋转半径是大约 10nm 到大约 80nm, 聚二甲基丙烯酰胺 (PDMA) 链是通过在该无规共聚物主要骨架存在下, 聚合 PDMA 制备得到; 其中, 所述链彼此缠结、互穿, 并且其中, 该类 -IPN 基本无化学交联。

[0022] 在另一具体实施例中, 本发明提供了一种由缠结的聚合物链构成的类互穿网络, 其由如下方法制备得到, 该方法包括: 提供一种包括 AM/DMA 无规共聚物和缓冲剂的溶液, 其中 AM/DMA 无规共聚物的重均分子量为 0.05×10^6 到 $2 \times 10^6 \text{g/mol}$; 提供一种包括聚二甲基丙烯酰胺 (PDMA) 和缓冲剂的溶液, 其中 PDMA 的重均分子量为 0.05×10^6 到 $25 \times 10^6 \text{g/mol}$; 以分步方式将该共聚物 / 缓冲剂溶液和 PDMA/ 缓冲剂溶液进行混合, 其中该共聚物 / 缓冲剂溶液的浓度是 PDMA/ 缓冲剂溶液浓度的 1 到 50 倍, 该共聚物 / 缓冲剂溶液的体积是 PDMA/ 缓冲剂溶液体积的约 1 到 20 倍; 其中, 制备得到缠结的共聚物和 PDMA 聚合物链的类互穿网络。

[0023] 在另一具体实施例中, 本发明提供了一种分离带电分子类物质的方法。该方法包括: 在外加电场的影响下, 使带电分子类物质在分离介质中发生迁移, 其中该分离介质的改进包括: AM/DMA 无规共聚物和 PDMA 聚合物, 其中, 该聚合物体系形成类互穿网络。

附图说明

[0024] 图 1 是样品 LPA 在 $1 \times \text{TTE}$ 缓冲溶液中的齐姆图。该图示出了在散射角在 15° 到 139° , 温度为 25°C 时, LPA 的静态光散射测量。

[0025] 图 2 为样品类互穿网络在 $1 \times \text{TTE}$ 缓冲溶液中的齐姆图。该图示出了在散射角为 15° 到 139° , 温度为 25°C 时, 包括 LPA 和 PDMA 的类互穿网络的静态光散射测量。

[0026] 图3示出了样品LPA的表观流体动力学半径分布,其在散射角为 30° ,温度为 25°C , $C = 3.387 \times 10^{-5} \text{g/ml}$ 时通过动态光散射测量获得。

[0027] 图4示出了样品类互穿网络表观流体动力学半径分布,其是在散射角为 30° ,温度为 25°C , $C = 3.201 \times 10^{-5} \text{g/ml}$ 时通过动态光散射测量获得。

[0028] 图5示出了通过CE分离DNA(pGEM-3Zf(+))从-21M13上游引物)。该分离在IPN/1×TTE+7M尿素缓冲溶液中, $C = 2.0\% \text{g/ml}$, 60°C 条件下进行。毛细管的有效长度是34cm, ID/OD = 75/365(μm)。分离在本实验室自制仪器中进行。

[0029] 图6示出了通过CE分离DNA(pGEM-3Zf(+))从-21M13上游引物)。该分离在MegaBACE LPA/1×MegaBACE缓冲液中, 44°C , 150V/cm的条件下进行。毛细管的长度为34cm, ID/OD = 75/365(μm)。分离在本实验室自制仪器中进行。

[0030] 图7示出了通过CE分离DNA(pGEM-3Zf(+))从-21M13上游引物)。该分离在POP6/1×TTE缓冲液中, 50°C , 200V/cm的条件下进行。毛细管的长度为34cm, ID/OD = 75/365(μm)。分离在本实验室自制仪器中进行。

[0031] 图8示出了通过CE电泳分离DNA BigDye Terminator v3.0的末端部分(碱基数目从600到~1000)。该分离在类互穿网络/1×TTE+7M尿素缓冲溶液中, $C = 2.0\% \text{g/ml}$, 60°C 的条件下进行。仪器:ABI Prism 310四色单毛细管遗传分析仪。

[0032] 图9示出了通过CE电泳分离DNA(BigDye Terminator v3.0)的蓝色-G部分。该分离在POP6/1×ABI缓冲溶液中进行。仪器:ABI Prism 310四色单毛细管遗传分析仪, 50°C , Module seqPOP6(1ml)E。毛细管 ID/OD = 50/361(μm)。

[0033] 图10示出了通过使用实验室自制测序分析仪,以2.5%类-IPN/1×ABI缓冲液作为分离介质,在少于~33min内测得的660bp的四色DNA(BigDye Terminator v3.0)序列。(仪器和base calling软件由Stony Brook大学Engineering College提供)

[0034] 图11示出了通过使用实验室自制测序分析仪,以POP7/1×ABI缓冲液作为分离介质,在~63min内测得的600个碱基的四色DNA序列(BigDye Terminator v3.0)。(仪器和base calling软件由StonyBrook大学Engineering College提供)

[0035] 图12示出了在LPA/PDMA类互穿网络介质中DNA(BigDyeTerminator v3.0)的分离,其中LPA(重量平均MW = $7.6 \times 10^6 \text{g/mol}$)和PDMA(重量平均MW ~ 470Kg/mol)的含量分别为83%和17%。工作电压195.5V/cm, DNA注入时间在27V/cm下20s。毛细管有效长度是33cm, ID/OD = 50/361(μm)。仪器:ABI Prism 310四色单毛细管遗传分析仪。

[0036] 图13示出了在类互穿网络(20805)介质中DNA(BigDyeTerminator v3.0)的分离。类互穿网络中PDMA和LPA的含量分别为~11%和~89%。工作电压195.5V/cm, DNA注入时间在27V/cm下20s。毛细管有效长度是33cm, ID/OD = 50/361(μm)。仪器:ABI Prism 310四色单毛细管遗传分析仪。

[0037] 图14示出了改变DNA注入电压:(a)25V/cm;(b)75V/cm;(c)100V/cm对DNA分离的分辨率的影响。该分离在实验室自制仪器中进行。注入时间是10秒;毛细管有效长度是35cm;毛细管ID = 75um;工作电场 = 150V/cm;缓冲溶液是1×TTE/7M尿素;DNA:pGEM3Zf(+)(C-mix)。

[0038] 图15示出了在有效柱长为(a)35cm和(b)40cm时DNA分离分辨率的变化。分离在实验室自制仪器中进行,注入电压和时间是75V/cm、10秒。仪器工作条件和DNA样品同

图 14 中所述。

[0039] 图 16 示出了工作电场强度为 (a) 200V/cm 和 (b) 150V/cm 时 pGEM3Zf(+) 第 581 个碱基后面的电泳图。分离在实验室自制仪器中进行,注入电压和时间是 75V/cm、10 秒。毛细管有效长度 = 40cm。仪器工作条件和 DNA 样品同图 14 中所述。

[0040] 图 17 示出了通过使用由 LPA 和 PDMA 比率为 (a) 1 : 0 (未涂布的毛细管); (b) 1.62 : 1; (c) 3.33 : 1; (d) 6.33 : 1 (e) 10.9 : 1 的类互穿网络作为分离介质的 DNA 测序样品的分离。分离在实验室自制仪器中进行,注入电压和时间是 75V/cm、10 秒。毛细管有效长度 = 40cm。仪器工作条件和 DNA 样品同图 14 中所述。

[0041] 图 18 示出了不同的 LPA 分子量: (a) $M_v = 4.53 \times 10^6 \text{g/mol}$; (b) $M_v = 6.4 \times 10^6 \text{g/mol}$; (c) $M_v = 7.69 \times 10^6 \text{g/mol}$; (d) $M_v = 9.91 \times 10^6 \text{g/mol}$ 对 DNA 分离的影响。分离在实验室自制仪器中进行,注入电压和时间是 75V/cm、10 秒。毛细管有效长度 = 40cm。仪器工作条件和 DNA 样品同图 14 中所述。

[0042] 图 19 示出了 DNA 分离结果的比较,其中 LPA 通过 (a) 无乳化剂聚合; (b) 反相微乳液聚合制备得到。分离在实验室自制仪器中进行,注入电压和时间是 75V/cm、10 秒。毛细管有效长度 = 40cm。仪器工作条件和 DNA 样品同图 14 中所述。

[0043] 图 20 示出了 DNA (BigDye Terminator v3.0) 的电泳图的黄色 -T 部分。仪器和工作条件同图 8 中相同。

[0044] 图 21 示出了 DNA (BigDye Terminator v3.0) 电泳图黄色 -T 部分中的单碱基分辨率,如图 20 所示。

具体实施方式

[0045] 本发明涉及用于分离带电大分子的毛细管电泳用分离介质,以及制备和使用该分离介质的方法。

[0046] 本发明中的分离介质包括一种聚合物或共聚链的“类互穿网络”(类-IPN)。这些链彼此互穿、互相缠结。在一个具体实施例中,类-IPN 包括线性聚丙烯酰胺 (LPA) 链和聚二甲基丙烯酰胺 (PDMA) 链。在另一具体实施例中,类-IPN 包括由丙烯酰胺 (AM) 和二甲基丙烯酰胺 (DMA) 链构成的无规共聚物,以及聚二甲基丙烯酰胺链。

[0047] 化学交联不要求出现在类-IPN 中。优选地,不出现化学交联。但是,由于实验条件不同,可能出现少量化学交联。基于本说明书的目的,少量化学交联的定义是:低于大约 5%、2%、1%、0.5% 或 0.2% 的聚合物链和另外的聚合物链发生化学交联。在类-IPN 的制备中不使用交联剂。

[0048] 一般而言,在本领域中,术语“互穿网络”用于描述一种聚合结构,该结构包含至少两种独立的化学交联聚合物网络,该网络彼此互穿,但是互不发生交联。因此,现有技术所熟知的互穿网络与本发明所涉及的类互穿网络间存在的差异在于:该类互穿网络组成了一种基本无化学交联的单一网络。

[0049] 该类-IPN 中的每种聚合物(或共聚物)提供对于分离介质不同的所需特性。如 LPA 具有亲水性,并且提供良好的分离效能,如分辨率高、读长长,和工作时间短。但是,由于 LPA 不能与毛细管内壁直接连接,这导致在电泳过程中产生不希望的电渗流。

[0050] PDMA 亲水性较差,能动态涂布毛细管内壁,因此可避免电渗流的产生。同时,PDMA

能抑制毛细管壁对带电大分子（如 DNA 片段）的非特异性吸附。

[0051] 本发明通过将这两种不同的聚合物，LPA 和 PDMA 在类 -IPN 中结合起来，将每种聚合物理想的特性结合到一种分离介质中。

[0052] 一般而言，在溶剂中，LPA 和 PDMA 链的相容性从彼此相互混溶到彼此不相互混溶。基于本说明书的目的，若 LPA 和 PDMA 链能混合在一起、且能长时期保持溶解状态，则将 LPA 和 PDMA 链定义成混溶；若即使在获得 LPA 和 PDMA 链的高度缠结的均一溶液时，LPA 和 PDMA 链最终也要发生相分离，则将 LPA 和 PDMA 链定义成不混溶。若 LPA 和 PDMA 链具有介于混溶和不混溶的聚合物链之间的一定程度的混溶性，则 LPA 和 PDMA 链是部分不混溶。

[0053] LPA 和 PDMA 链的混溶性受到几个因素的影响，如溶剂中总聚合物浓度、聚合物的分子量、以及每种聚合物的相对含量。随着总聚合物浓度的增加，和 / 或聚合物分子量增加，和 / 或 LPA 作为主要组分的溶液中 PDMA 相对含量增加，混溶性降低。

[0054] 要获得用于分离介质的适合网孔大小，要求有一定的最小总聚合物浓度。一般而言，为获得对于绝大部分测序分离适合的网孔大小，要求总聚合物浓度大约是 1.5wt% 的数量级或更高。在 LPA 和 PDMA 链相对含量相当，同时其分子量高时，在总聚合物浓度为 1.5wt% 时，LPA 和 PDMA 链彼此部分不混溶。但是，通过使部分不混溶的 LPA 链和 PDMA 链形成类 -IPN，至少一旦在需要进行带电生物分子的分离时，该 LPA 链和 PDMA 链应能彼此缠结、互穿。

[0055] 类互穿网络中的 LPA 链和 PDMA 链至少在聚合物链彼此排斥这点上不相同。因此，该链在溶液中变得伸展，超过其正常构象。因此，与不以类互穿网络形式存在的组成型 LPA 链和 PDMA 链的重量 / 体积比之和相比较，溶液中的类互穿网络的重量 / 体积比更小。更充分伸展的构象能有效提供一种更好的分离介质，同时将形成理想的网孔大小所需的聚合物材料的数量减少到最少程度。

[0056] LPA 和 PDMA 链必须混溶到这样的程度，即至少一旦在需要进行带电大分子的分离时，该聚合物链应能保持彼此缠结。如此，当类互穿网络被置于测序缓冲介质中时，该类互穿网络以均一的、凝胶状的溶液形式存在。

[0057] LPA 链、PDMA 链和类互穿网络的某些物理性能被确定。这些特性包括分子量、多分散指数、旋转半径和流体动力学半径。这些特性影响由特定的类互穿网络提供的分离效能。基于类互穿网络的具体应用，这些特性可以被改变以最优优化分离结果。这些特性将在下文中进行探讨。

[0058] 单一聚合物链的分子量通过将单体的分子量和聚合物链中单体数量简单相乘得到。聚合物溶液中包括多种具有不同分子量的聚合物链。溶液中聚合物的分子量即是溶液中聚合物链的分子量的平均值。有几种方式来描述溶液中聚合物的平均分子量。

[0059] 一种描述溶液中聚合物分子量的方式是通过确定溶液中聚合物的“数均分子量”(M_n)。数均分子量被定义为溶液中聚合物链的总分子量除以溶液中聚合物链的总数量。也就是说， $M_n = \sum n_i M_i / \sum n_i$ ，其中 n_i 是溶液中分子量为 M_i 的聚合物链的数目。

[0060] 另一种描述聚合物分子量的方式是通过确定“重均分子量”(M_w)。重均分子量被定义成 $n_i M_i^2$ 的总和除以 $n_i M_i$ 的总和，其中 n_i 是分子量为 M_i 的聚合物链的数目。也就是说， $M_w = \sum n_i M_i^2 / \sum n_i M_i$ 。重均分子量可以通过静态激光散射实验测定。

[0061] 比值 M_w/M_n 被定义成聚合物的多分散指数。该指数是聚合物链的尺寸分布量度。

多分散材料的重均分子量一般比数均分子量大。若多分散指数的值接近1,则聚合物链尺寸大小更接近。正如本领域技术人员所熟知的那样,多分散指数能使用数值计算法,即 CONTIN 法 (Provencher, Comput. Phys. Commun. 27 : 229 (1982)) 并结合动态光散射测定法估算得到。

[0062] 旋转半径 (R_g) 是聚合物链的尺寸量度。它是根据聚合物链中分子量为 m_i 的每个单体距聚合物链重心的距离分布来定义的,即: $R_g^2 = \sum m_i r_i^2$ 。溶液中聚合物的旋转半径可以通过静态激光散射实验来实验确定。旋转半径在交叠浓度之后测定。

[0063] 另外,若已知溶液中特定的聚合物的旋转半径 R_g 和相应的重均分子量 (M_w) 两值,那么在相同溶液中,具有不同已知 M_w 的聚合物,其旋转半径能估算得到。这个估算方法使用下面公式: $R_g = K_g M_w^\alpha$, 其中, K_g 是常数。在一种为本领域技术人员承认的良好的溶剂中,指数 α 大约是 0.58。

[0064] 旋转半径相关的一个特性是流体动力学半径 (R_h)。通过使用动态光散射实验测定聚合物分子的迁移率 (根据稀溶液中的平移扩散系数),可确定溶液中聚合物分子的流体动力学半径。正如本领域的技术人员所熟知的那样, $R_g : R_h$ 比值取决于聚合物分子的构象。

[0065] 本发明中的类互穿网络不能通过简单地将 LPA 和 PDMA 混合制备,而是使用特定的合成方法,以影响这些聚合物链的缠结和互穿。

[0066] 一种优选的用于制备类互穿网络的合成方法包括:由 LPA,或 AM/DMA 共聚物形成聚合物网络,或“主要骨架”。基于本发明中的目的,主要骨架包括溶剂中的 LPA 聚合物分子、或 AM/DMA 共聚物分子,其中,如下文所述,对于特定的溶剂,溶液的浓度远远高于 LPA,或 AM/DMA 共聚物的交叠浓度 (C^*)。

[0067] 溶液中聚合物的交叠浓度是指:聚合物分子第一次相互交织、并变得彼此缠结时的最低浓度。因此,聚合物溶液的特征在交叠浓度时通常显著改变。与更稀浓度时的单个聚合物分子相比,交叠浓度时的单个聚合物分子,对毗邻分子的运动影响更大。比如,聚合物分子的运动更受限于毗邻分子。同样地,一般而言,溶液粘度急剧增加。

[0068] 交叠浓度可根据聚合物溶液的各种可测定的特性来决定。比如,一般而言,聚合物溶液的交叠浓度被估算为溶液固有粘度 ($[\eta]$) 的倒数。

[0069] 并且,交叠浓度可根据溶液中聚合物的分子量 M 和旋转半径 (R_g),利用公式: $C^* \sim M/R_g^3$ 估算得到。分子量和旋转半径能通过本领域所熟知的光散射实验来实验测定。B. Chu, “Laser Light

[0070] Scattering: Basic Principles and Practice,” 2nd Edition, Academic Press, Boston (1991) pp. 343。

[0071] LPA 主要骨架通过使用任何合适的聚合方法聚合丙烯酸胺单体形成。一旦溶液达到交叠浓度, LPA 主要骨架就能形成。聚合方法的实例包括:反相微乳液聚合、无乳化剂聚合、常规的和种子乳液聚合 (conventional and seeded emulsion polymerization)、以及分散和悬浮聚合。

[0072] 优选产生高分子量的 LPA 的聚合方法,如,反相微乳液聚合。反相微乳液聚合方法为本领域所熟知。反相微乳液包含被油性分子包裹的纳米尺寸级水滴。在引发剂,如 UV 辐射或者热引发剂的触发下,在水滴内发生聚合。无乳化剂聚合也可合成高分子量 LPA 分子。

[0073] 优选的是具有分子量分布范围相当窄,也就是多分散指数小的 LPA。反相微乳液聚

合提供了多分散指数小的 LPA。

[0074] 在整个说明书中,有由上限和下限所定义的范围。每个下限可以与每个上限结合定义一个范围。上下限均可作为独立要素。

[0075] 优选地,主要骨架 LPA 的物理性质在缓冲溶液中存在 LPA 时测定。恰当的缓冲剂的实例包括:Tris-TAPS-EDTA(TTE), Tris- 硼酸 (Borate)-EDTA(TBE) 和 Tris- 冰醋酸-EDTA(TAE)。LPA 如下的物理性质在 $1 \times \text{TTE}$ 缓冲溶液中测定。 $1 \times \text{TTE}$ 缓冲溶液含 50mM Tris ;50mM TAPS ;和 2.0mM EDTA。

[0076] 交叠浓度取决于 LPA 的分子量和溶剂。 $1 \times \text{TTE}$ 中 LPA 的交叠浓度范围的下限大约是 $5.0 \times 10^{-4} \text{g/ml}$ 。其它下限的实例包括: $5.0 \times 10^{-3} \text{g/ml}$ 和 $9.0 \times 10^{-3} \text{g/ml}$ 。 $1 \times \text{TTE}$ 中 LPA 的交叠浓度范围的上限大约是 $4.0 \times 10^{-2} \text{g/ml}$ 。其它下限(上限)的实例包括: $1.0 \times 10^{-2} \text{g/ml}$ 和 $2.0 \times 10^{-2} \text{g/ml}$ 。一个交叠浓度的具体的实例大约是: $1.2 \times 10^{-3} \text{g/ml}$ 。

[0077] 优选地, LPA 链的重均分子量范围的下限大约是 $0.05 \times 10^6 \text{g/mol}$ 。其它下限的实例包括大约 0.1×10^6 、 0.3×10^6 、 1×10^6 、 4×10^6 、 6×10^6 、和 $7 \times 10^6 \text{g/mol}$ 。

[0078] 优选地, LPA 链的重均分子量范围的上限大约是 $25 \times 10^6 \text{g/mol}$ 。其它上限的实例包括大约 8×10^6 、 10×10^6 和 $15 \times 10^6 \text{g/mol}$ 。LPA 重均分子量的一实例是 $7.6 \times 10^6 \text{g/mol}$ 。

[0079] 优选地, LPA 链的多分散指数的范围是窄的。比如,优选地,多分散指数范围的下限大约是 1.01。其它下限的实例包括大约 1.02、1.05 和 1.1。

[0080] 优选地,多分散指数范围的上限大约是 1.8。其它上限的实例包括约 1.3、1.5 和 1.6。一个 LPA 多分散指数的实例是 1.3。

[0081] 优选地,缓冲溶液中的 LPA 的旋转半径范围的下限大约是 10nm。其它下限的实例包括大约 15nm、28nm、55nm、125nm、150nm、和 165nm。

[0082] 优选地,缓冲溶液中 LPA 的旋转半径范围的上限大约是 350nm。其它上限的实例包括大约 180nm、210nm 和 250nm。一个 LPA 旋转半径的实例是大约 180nm。

[0083] 溶液中 LPA 的流体动力学半径的范围与良好溶剂中 LPA 的 R_g 范围相吻合,这将被本领域中的技术人员所熟知。溶液中 LPA 的流体动力学半径的实例是大约 81nm。

[0084] 将二甲基丙烯酰胺单体和 LPA 主要骨架聚合。通过采用任何适合的方法聚合二甲基丙烯酰胺单体,如,比如,使用同上文所述的制备 LPA 的相同的方法。优选自由基聚合。

[0085] 优选地,由 LPA 和 PDMA 链形成的类互穿网络的重均分子量范围的下限是大约几十万。其它下限的实例包括大约 0.1×10^6 、 0.5×10^6 、 2×10^6 、和 $6 \times 10^6 \text{g/mol}$ 。

[0086] 优选地,由 LPA 和 PDMA 链形成的类互穿网络的重均分子量范围的上限是大约 $20 \times 10^6 \text{g/mol}$ 。其它上限的实例包括大约 7×10^6 、 10×10^6 和 $16 \times 10^6 \text{g/mol}$ 。一个 LPA/PDMA 类互穿网络的重均分子量的具体实例是大约 $6.4 \times 10^6 \text{g/mol}$ 。

[0087] 优选地,类互穿网络具有组成型聚合物,其中,每种组成型聚合物的多分散指数范围的下限是大约 1。其它下限的实例包括大约 1.05 和 1.1。

[0088] 优选地,类互穿网络具有组成型聚合物,其中,每种组成型聚合物的多分散指数范围的上限是大约 1.8。其它上限的实例包括大约 1.3 和 1.5。

[0089] 在优选的具体实施例中,类互穿网络中的 LPA 和 PDMA 的旋转半径范围的下限大约低于 10nm。其它下限的实例包括大约 15nm、40nm、80nm 和 150nm。

[0090] 优选地,类互穿网络中的 LPA 和 PDMA 的旋转半径范围的上限大约是 320nm。其它

上限的实例包括大约 165nm、210nm 和 280nm。类互穿网络中的旋转半径的一实例是大约 153nm。

[0091] 由 LPA 和 PDMA 链构成的类互穿网络在 1×TTE 中的交叠浓度大约是 5×10^{-4} 到 3.0×10^{-2} g/ml。一个交叠浓度的具体的实例是大约 5.5×10^{-3} g/ml。

[0092] LPA 的重量分子量的范围在大约 6×10^6 到 7×10^6 g/mol 之间时, LPA 含量和 PDMA 含量比率的范围在大约 10 : 1 到 15 : 1 之间。

[0093] 通过首先提供 LPA 主要骨架, 允许 LPA 和 PDMA 在高的聚合物浓度下混合, 由此能够制备均一的、凝胶状的溶液, 从而形成类互穿网络。即使在较高浓度条件下 LPA 和 PDMA 变得不混溶, 且在相当的时间出现肉眼可见的相分离, 这种方法也可得以实施。

[0094] 在 LPA 浓度较高时, 如: 大于大约 4.0×10^{-2} g/ml, PDMA 和 LPA 变得基本上不混溶。但是, 在本发明中的一个具体实施例中, 类互穿网络由 AM 和 DMA 的无规共聚物, 和均聚物 PDMA 形成。(AM/DMA 的) 无规共聚物为在高的总聚合物浓度、且没有出现相分离的条件下(与 PDMA) 形成类互穿网络提供可能。

[0095] 在所述的具体实施例中, 通过使用任何适当的聚合方法, 在缓冲液中将丙烯酰胺和二甲基丙烯酰胺单体聚合。自由基聚合是优选的聚合方法。一旦缓冲溶液中达到交叠浓度, 则由 AM 和 DMA 无规共聚物链形成无规共聚物的主要骨架。缓冲溶液中无规共聚物的交叠浓度大约是 3×10^{-3} 到 4.0×10^{-2} g/ml。缓冲溶液中所述范围的另一下限是 5.0×10^{-3} g/ml。缓冲液中所述范围的另一上限是 3.0×10^{-2} g/ml。缓冲溶液(如 1×TTE) 中的交叠浓度的一具体实例是大约 1.0×10^{-2} g/ml。

[0096] 优选地, 构成主要骨架的 AM/DMA 无规共聚物链的重均分子量范围的下限是大约 0.05×10^6 g/mol。其它下限的实例包括大约 0.1×10^6 和 0.3×10^6 g/mol。

[0097] 优选地, 构成主要骨架的 AM/DMA 无规共聚物链的重均分子量范围的上限是大约 2×10^6 g/mol。其它上限的实例包括 0.5×10^6 和 1×10^6 g/mol。

[0098] 优选地, 在类互穿网络中 AM 含量和 DMA 含量的比率范围的下限大约是 5 : 1。其它的下限实例包括 10 : 1 和 20 : 1。优选地, 在类互穿网络中 AM 含量和 DMA 含量的比率范围的上限大约是 50 : 1。其它上限的实例包括 30 : 1 和 40 : 1。

[0099] 优选地, 缓冲溶液中 AM/DMA 无规共聚物的旋转半径大约介于 10nm 到 80nm 之间。该范围的下限的实例是大约 10nm、15nm 和 30nm。该范围的上限的实例是大约 40nm、55nm 和 80nm。优选地, 该无规共聚物的多分散指数介于大约 1.1 到 2 之间。

[0100] 通过使用任何合适的聚合方法, 在无规共聚物主要骨架存在时, 通过聚合 DMA 可制备得到 PDMA 链。自由基聚合是优选的聚合方法。

[0101] 优选地, 类互穿网络的组成型聚合物和共聚物的重均分子量范围的下限大约是 0.1×10^6 g/mol, 其中该类互穿网络由 AM/DMA 共聚物和 PDMA 聚合物形成。下限的其它实例包括大约 0.5×10^6 g/mol 和 0.8×10^6 g/mol。

[0102] 优选地, 类互穿网络的组成型聚合物和共聚物的重均分子量范围的上限大于 2×10^6 g/mol, 其中该类互穿网络由 AM/DMA 共聚物和 PDMA 聚合物构成。上限的其它实例包括大约 1×10^6 g/mol 到 2×10^6 g/mol。

[0103] 优选地, 该聚合物和共聚物的旋转半径范围的下限大约是 15nm。下限的其它实例包括大约 40nm 和 50nm。

[0104] 优选地,该聚合物和共聚物的回转半径范围的上限大约是 80nm。上限的其它实例包括大约 55nm 和 65nm。

[0105] 优选地,无规共聚物和 PDMA 聚合物的多分散指数介于大约 1.1 到 2 之间。多分散指数的一具体实例是大约 1.6。应注意到的是:存在两种类型的聚合物,其中每种都有自己的多分散指数,这加宽了类互穿网络的多分散指数,尤其是在两种聚合物的分子量大大不同时。

[0106] 在本发明中的可选具体实施例中,制备类互穿网络的方法可通过混合溶液法实现。在该方法中,形成类互穿网络的聚合物和/或共聚物要求在聚合物的混合物的均一、单相区域中能彼此相容。

[0107] 在该方法中,提供了 LPA 和 PDMA 的单独的溶液。这些溶液中的溶液之一,优选 PDMA 溶液,较 LPA 溶液更稀。用于这些溶液的溶剂的实例包括水和缓冲溶液。合适的缓冲溶液的实例包括 Tris-TAPS-EDTA (TTE)、Tris- 硼酸 -EDTA (TBE)、和 Tris- 冰醋酸 -EDTA (TAE)。将两种聚合物彻底混合,为聚合物链互穿提供可能。将两种聚合物溶液与两种远远高于交叠浓度的溶液混合没有效用。

[0108] LPA 溶液的浓度大约是 PDMA 溶液浓度的 1 到 15 倍。在 LPA 和 PDMA 浓度相同的具体实施例中,PDMA 的体积相应地降低。LPA 溶液的体积大约是 PDMA 溶液体积的 1 到 50 倍。在 LPA 和 PDMA 体积相同的具体实施例中,PDMA 的浓度相应地降低。

[0109] 以分步方式将 PDMA 溶液加入 LPA 溶液中。每次加入后,将得到的溶液充分混合。基于本说明书中的目的,分步方式意味着 PDMA 溶液总量的部分被加入到 LPA 溶液中,并且在每部分加入之后,将得到的溶液充分混合。被加入部分的实例包括三分之一的 PDMA 溶液、四分之一的 PDMA 溶液、五分之一的 PDMA 溶液、十分之一的 PDMA 溶液、和二十分之一的 PDMA 溶液。

[0110] 在该具体实施例中,优选地,LPA 的重均分子量范围的下限大约是 $0.05 \times 10^6 \text{g/mol}$ 。其它下限的实例包括大约 0.1×10^6 、 0.3×10^6 、和 $1 \times 10^6 \text{g/mol}$ 。

[0111] 优选地,LPA 的重均分子量范围的上限大约是 $25 \times 10^6 \text{g/mol}$ (或尽可能高)。其它上限的实例包括大约 4×10^6 、 6×10^6 、 7×10^6 、 8×10^6 、 10×10^6 、 15×10^6 和 $20 \times 10^6 \text{g/mol}$ 。LPA 重均分子量的一实例是 $6.4 \times 10^6 \text{g/mol}$ 。

[0112] LPA 溶解在含水溶液中,如水,或缓冲溶液。合适的缓冲剂的实例包括 TTE、TBE 和 TAE。优选的缓冲溶液的一实例是 $1 \times \text{TTE} + 7\text{M}$ 尿素缓冲液。LPA/ 缓冲剂溶液,如 LPA/TTE 溶液,其浓度范围的下限优选是大约 1.0% g/ml。下限的其它实例包括 4.0% 和 6.0% g/ml。LPA/ 缓冲剂溶液,如 LPA/TTE 溶液,其浓度范围的上限优选是大约 12.0% g/ml。上限的其它实例包括 8.0% 和 10.0% g/ml。随着浓度的增加,类互穿网络的网孔大小降低。LPA/TTE 溶液浓度的一实例是大约 2.6% g/ml。

[0113] 优选地,PDMA 的重均分子量范围的下限大约是 100,000g/mol。其它下限的实例包括大约 300,000 和 500,000g/mol。优选地,PDMA 的重均分子量范围的上限大约是 $25 \times 10^6 \text{g/mol}$ 。其它上限的实例包括大约 1×10^6 、 3×10^6 和 $10 \times 10^6 \text{g/mol}$ 。PDMA 重均分子量的一个实例是 470,000g/mol。

[0114] PDMA 溶于含水溶液中,如水或缓冲溶液。适当的缓冲剂的实例包括 TTE、TBE 和 TAE。优选的缓冲溶液的实例是 $1 \times \text{TTE} + 7\text{M}$ 尿素缓冲液。PDMA/ 缓冲剂溶液,如 PDMA/TTE 溶

液,其浓度范围优选介于大约 0.1% g/ml 到 3.0% g/ml 之间。PDMA/TTE 溶液的浓度的一个实例是大约 1.6% g/ml。

[0115] 在通过该方法制备得到的类互穿网络中, LPA 大约是 PDMA 的 3.0 到 15.0 倍。比如,类互穿网络可以包括大约 85wt% LPA 和 15wt% PDMA。

[0116] 溶液混合法也可用于制备 AM/DMA 无规共聚物和 PDMA 的类互穿网络。制备 AM/DMA 无规共聚物和 PDMA 的独立的缓冲溶液。合适的缓冲溶液的实例包括 TTE、TBE 和 TAE., 这些溶液中的一种溶液, 优选 PDMA 溶液, 较无规共聚物溶液更稀。该聚合物和共聚链充分混合, 为该链互穿提供可能。

[0117] AM/DMA 的无规共聚物溶液的浓度大约是 PDMA 溶液浓度的 1 到 50 倍。在该共聚物和 PDMA 浓度相同的具体实施例中, PDMA 的体积相应地减少。该无规共聚物溶液的体积大约是 PDMA 溶液体积的 1 到 20 倍。在该共聚物和 PDMA 体积相同的具体实施例中, PDMA 的浓度相应地降低。该共聚物 / 缓冲剂溶液的浓度大约是 5.0 到 20.0% g/ml, 优选大约 7% 到 12% g/ml。PDMA / 缓冲剂溶液的浓度大约是 0.1 到 1.0% g/ml。

[0118] 如前文关于 LPA 和 PDMA 的描述那样, 以分步方式将 PDMA 溶液加入到无规共聚物溶液中。

[0119] 在该具体实施例中, 优选地, 该无规共聚物的重均分子量范围的下限大约是 0.05×10^6 g/mol。其它下限的实例包括大约 0.1×10^6 , 和 0.3×10^6 g/mol。优选地, 该无规共聚物的重均分子量范围的上限大约是 2×10^6 g/mol (或尽可能高, 但在可接受的粘度范围内)。其它上限的实例包括大约 0.5×10^6 、 1×10^6 和 1.5×10^6 g/mol。

[0120] 优选地, PDMA 的重均分子量范围的下限大约是 50,000 g/mol。其它下限的实例包括 100,000 和 200,000 g/mol。PDMA 的重均分子量范围的上限大约是 25×10^6 g/mol。其它上限的实例包括 500,000、 1×10^6 、 3×10^6 、 5×10^6 和 10×10^6 g/mol。

[0121] 通过该方法制备得到的类互穿网络, 其无规共聚物较 PDMA 大约高达 50 倍。

[0122] 本发明中所有具体实施例中制备得到的类互穿网络可作为带电分子类物质的分离介质, 如毛细管电泳或芯片上的 DNA / 蛋白分析。生物分子的实例包括核酸分子和蛋白质。

[0123] 在不考虑仪器变量的情况下, 就给定的聚合物, 用于 DNA 序列分析的毛细管电泳的分离条件的最优化取决于三个主要因素: 聚合物浓度、样品注入量和电场强度。分离介质中聚合物的浓度影响到分辨率、工作时间和读长。浓度越高, 分辨率越高, 但是浓度越低, 粘度越低, 分离更快, 读长更长。最佳浓度应该在尽可能低的浓度条件下, 分辨率足够高。样品注入量影响到分辨率和信号噪声比。为实现最佳效果, 注入量应该保持最少, 以提供高分辨率和足够高的信号噪声比。电场强度应该适当高, 比如大约 150V/cm。就较小片段而言, 电场强度越高, 分离更快捷, 分辨率更高。但是, 如果电场强度过高, 较大片段的分辨率就会降低, 同时读长缩短。

[0124] 作为 DNA 分离介质, 类互穿网络成功地结合了 PDMA 的动态涂布能力和 LPA 的亲水性。同时, 由于这两种聚合物体系的部分不相容性, LPA 和 PDMA 链均得到超过其自然构象的伸展。这种伸展提高了类互穿网络作为分离介质的效率, 同时将用于获得理想网孔大小所使用的聚合物材料量降低到最小。通过使用裸露毛细管而不增加另外的聚合物涂布步骤就能获得高效的分离分辨率。

[0125] 包括 LPA 和 PDMA 的类互穿网络作为分离介质,其性能受到几个变量的影响。比如,如前文所述,LPA 的分子量及其分子量分布,在 DNA 测序分析中起着重要的作用。LPA 分子量越高,同时分子量分布范围越窄,其分辨率越高,同时分离能力越稳定。

[0126] 另外,相对于 LPA 的分子量,LPA 与 PDMA 的比率影响到分离效果。就 LPA 的每个重量分子量范围而言,LPA :PDMA 比率可优化分离效果。比如,就重均分子量大约是 6×10^6 到 7×10^6 的 LPA 而言,LPA :PDMA 比率的范围介于大约 10 : 1 到 15 : 1 时最佳。即使总聚合物浓度相当低,若 PDMA 含量进一步增加,可能导致该聚合物体系的微相分离,不利于分离效果。

[0127] 如图 20 和 21 所示,在最佳的工作条件下,通过使用 2.0w/v% LPA 和 PDMA, LPA : PDMA 比为 10 : 1 作为分离介质,在 60°C,大约 35 分钟内,对于 858 个碱基的单个碱基分辨率可达到 0.50 以上,对于 1000 个碱基的单碱基分辨率为 ~ 0.3 以上。值得注意的是:LPA 和 PDMA 总分子量越高,性能会得到进一步提高。

[0128] 由于该聚合物不通过交联剂进行化学连接,因此该类互穿网络可以容易地从毛细管中去除。因此,如果必要,在每次电泳工作后,这些聚合物溶液可以被替换。这样的特征使本发明中的分离介质非常适用于自动毛细管电泳。

[0129] 制备类互穿网络的关键点在于:1) 选择最有效的分离聚合物;2) 将该分离聚合物和另外的聚合物混合均匀,该另外的聚合物能动态涂布毛细管的内壁或分离芯片;以及 3) 每种聚合物均高于自身的交叠浓度。因此,主要骨架聚合物应该具有在总聚合物浓度(即由所需网孔大小决定的浓度)中的体系所允许的最高聚合物比率。该涂布聚合物应尽量少,但需高于自身的交叠浓度。就用于测序分析的分离介质而言,由于总聚合物浓度相对较低,很容易满足该要求。就芯片上进行的 DNA 分析而言,即对于使用较短的通道长度(信道长度)和较小的带电分子大小进行快速分析,网孔大小更小,所需总聚合物浓度变得更高。在这种浓度条件下,即便对于在低聚合物浓度时能混溶的 LPA 和 PDMA 而言,也会出现相分离。基于此,在总聚合物浓度较高时,类互穿网络中的聚合物的相容性可通过利用 AM/DMA 无规共聚物调节,其中,调节该共聚物中 DMA 的含量,使 PDMA 同 AM/DMA 的无规共聚物在所需浓度范围内变得混溶。类互穿网络分离介质应该使用本发明中的方法彻底混合,即通过一种聚合物在另外的主要骨架聚合物中进行原位聚合,或通过分步法。为获得可重复性的结果,混合溶液在分子水平上应该保持均一,但这并不取决于视觉观察。

[0130] 实施例

[0131] 实施例 1

[0132] 材料和方法

[0133] 过硫酸铵 (APS)、三(羟甲基)氨基甲烷 (Tris)、N-三-(羟甲基)甲基-3-氨基丙烷磺酸 (TAPS)、乙二胺四乙酸 (EDTA) 和丙烯酰胺购自 Sigma 公司 (St. Louis, MO, USA)。丙烯酰胺由氯仿两次重结晶。将磺基丁二酸二(2-乙基己基)酯 (AOT, Fluka) 溶于甲醇中以去除盐分,然后过滤。然后将滤液和石油醚一起振荡,以便抽提有机杂质。随后除去溶剂,在五氧化二磷的存在下,于 50°C 真空干燥沉淀物。偶氮二异丁腈 (AIBN) 由乙醇两次重结晶。N,N,N',N'-四亚甲基二胺 (TEMED) 购自 Fisher Scientific (Pittsburgh, PA)。DMA 购自 Polysciences (Warrington, PA, USA), 使用前在 80°C /20mmHg 下蒸馏。阳极和阴极工作缓冲液均是 1×TTE (50mM Tris/50mM TAPS/2.0mM EDTA)。同分离基质一样,阴极工作缓

冲液也包括 -7M 尿素。所有反应和溶液中使用的水均经 Milli-Q 水净化系统 (Millipore, Bedford, MA, USA) 去离子化至 18.2 MΩ。

[0134] 通过反相微乳液聚合制备 LPA

[0135] 表 1 列出了典型的 LPA 制备方法。聚合反应在氮气中, 45°C, 搅拌速度为 350rpm 的条件下进行。除 AIBN 溶液外, 所有成分均放置在 150ml 四颈圆底烧瓶中。该圆底烧瓶配备有机械搅拌器、回流冷凝器、温度计、氮气进气管, 和加料漏斗。在 AIBN 溶液加入前, 反应系统用氮气吹扫一个小时。聚合结束后, 在过量丙酮中沉淀, 连续洗涤、过滤和 50°C 真空干燥, 从而回收聚丙烯酰胺。

[0136] 表 1 聚丙烯酰胺聚合^a方法

[0137]

样品	AOT(g)	AM(g)	水(g)	甲苯(g)	AIBN(g)	$M_v \times 10^{-6}$
^b A-0	0	6.87	7.65	68.44	0.0035	9.96
A-1	17.04	6.87	7.65	68.44	0.0035	4.53
A-2	16.50	7.07	7.65	68.44	0.0035	6.41
A-3	16.50	7.87	7.65	68.44	0.0035	7.69
A-4	16.50	8.37	7.65	68.44	0.0035	9.91

[0138] a): 聚合时间 :2h

[0139] b): 聚合温度 :60°C

[0140] 制备类互穿网络

[0141] 将 LPA 溶解入 100ml 四颈圆底烧瓶中的水中, 该圆底烧瓶配备有机械搅拌器、回流冷凝器、温度计、氮气进气管, 和加料漏斗。加入 DMA 后, 反应系统用氮气吹扫一个小时, 然后加入 APS 和 TEMED。聚合结束后, 在过量丙酮中沉淀, 随后连续洗涤、过滤和 50°C 真空干燥, 从而回收类互穿网络。表 2 列出了典型的制备基于 LPA 和 PDMA 的类互穿网络的方法。

[0142] 表 2 基于丙烯酰胺和二甲基丙烯酰胺的类互穿网络的制备方法

[0143]

样品	A-0 (g)	A-1 (g)	A-2 (g)	A-3 (g)	A-4 (g)	H ₂ O (g)	DMA (g)	APS	TEMED (μl)	[LPA]: [PDMA]
D0	0.5					50	0.1	0.0021	3	11.0
D1		0.5				50	0.1	0.0021	3	10.8
D2-1			0.5			50	0.42	0.0021	3	1.62
D2-2			0.5			50	0.31	0.0021	3	3.33
D2-3			0.5			50	0.21	0.0021	3	6.33
D2-4			0.5			50	0.1	0.0021	3	10.9
D3				0.5		50	0.1	0.0021	3	11.1
D4					0.5	50	0.1	0.0021	3	11.2

[0144] 聚合温度 :0°C

[0145] 聚合时间 :24h

[0146] 聚合物的特征

[0147] 利用 Ubbelohde 粘度计测定 1M NaNO₃ 水溶液中 LPA 的固有粘度 $[\eta]$, 通过外推法计算 30°C、零浓度时该 LPA 的固有粘度。使用下面的公式计算合成的 LPA 的粘度 - 平均分子量 (M_v) (表 1): $[\eta] = 3.73 \times 10^{-2} M_v^{0.66} \text{ cm}^3/\text{g}$ 。

[0148] 通过 $AC250^{-1}H-NMR$ 测定类互穿网络的组合物, 其以 D_2O 作为溶剂。类互穿网络中 LPA 与 PDMA 的比率 (表 2) 以位于 2.1 和 2.6ppm 的峰的积分峰面积比估算。

[0149] 测序化学

[0150] 使用具有 **AmpliTaq**[®] DNA 聚合酶的 ABI PRISM[™]Dye Primer(-21M 13forward) Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, pGEM3Zf(+) 双链模板上的 F S(PE Biosystems/Perkin-Elmer, Foster City, CA, USA) 进行测序反应。使用 FAM 标记的引物和 C 端混合物进行单染料标记的测序反应。DNA 测序利用 GeneAmp PCR System2400(PE Biosystems/Perkin-Elmer) 进行, 循环条件如下: 95°C 10 秒、50°C 5 秒和 70°C 1 分钟的 15 个循环, 随后 95°C 10 秒和 70°C 1 分钟的 15 个循环。反应产物经乙醇沉淀纯化、随后用 95% 和 75% v/v 乙醇洗涤两次、20 μ l 去离子甲酰胺中重新悬浮。

[0151] 激光诱导的荧光检测

[0152] 氩离子激光器被用于形成 $\lambda = 488nm$ 的激发光束和大约 5mW 的入射功率。该激光束经焦距为 25cm 的透镜聚焦、通过分色镜 (550DRLP; Omega Optical, Brattleboro, VT) 反射, 然后使用 10 $\times$ 物镜再次聚焦在分离通道内的点上。经分色镜的荧光在进入光电倍增管 (Hamamatsu R928, Hamamatsu Corporation, NJ) 前, 由带通滤波器 (530DF30, Omega Optical, Brattleboro, VT) 进行过滤。为获得毛细管图像, 该装置还连有电荷耦合装置 (CCD) 摄像机 (SONY SSC-M350, SONY Corporation, New York, NY)。显微镜上的发光装置发出的白色光束照亮毛细管。然后, 它通过物镜聚焦、通过滑入 / 滑出镜 (slide in-and-out mirror) 反射, 通过 Zoom 6000 系统放大 (D. O Industries, Rochester, NY), 随后通过 CCD 摄像机检测。显微镜 (KarlZeiss, Melville, NY) 和 CCD 摄像机提供了获得优良光学质量和快速对准的方法。

[0153] CE 步骤

[0154] 1. 针对实验室自制的 CE 仪器

[0155] 使用具有 75/365 μ m 的 ID/OD 的熔融石英毛细管 (PolymicroTechnologies, Phoenix AZ)。通过用刀片剥开聚酰亚胺涂层在距阳极端 8cm 处开放检测窗。毛细管用 1M HCl 简单洗涤 10min。使用气密注射器将分离介质注入毛细管。每次电泳工作前, 将毛细管柱在 300V/cm 电场强度下进行调试, 直至电流稳定 (一般约 10min)。以电动方式将 DNA 样品注入毛细管。附图说明中列出了具体注入条件、具体长度和电泳条件。

[0156] 2. 针对 ABI-310 步骤同 (1), 但遵循 ABI 过程的常规操作。

[0157] 实施例 2: 变量

[0158] 工作条件的影响

[0159] 工作条件, 如 DNA 注入宽度、有效柱长和工作电场强度, 对类互穿网络在 DNA 分离中的性能影响非常大。为了比较, 根据下面的公式计算所选 DNA 片段的分辨率 (R): $R = 2(t_2 - t_1) / [1.699(w_2 + w_1)]$, 其中 t 和 w 分别表示迁移时间和 1/2 最大高度的全峰宽度。

[0160] 在 CE 中, DNA 样品一般是通过电动注射方式注入毛细管柱。初始 DNA 带宽或被注入的 DNA 的量通过调节注入电压和注入时间间隔进行调控。

[0161] 图 14 示出了使用实施例 1 中的类互穿网络在不同 DNA 注入电压下的分辨率的变化。保持注入时间间隔 (10s) 不变, 利用公式 (2) 计算注入电压为: 25V/cm、75V/cm、和 100V/cm 时碱基片段分离的分辨率, 同时相对于片段长度对分辨率作图 (图 14), 其中被

检测碱基片段长度为：103/104、158/159、186/187、216/217、280/281、310/311、357/358、411/413、716/720 和 833/836。（其中 411/413 碱基对的分辨率除以 2，716/720 碱基对的分辨率除以 4，和 833/836 碱基对的分辨率除以 3）。与注入电压 100V/cm 和 25V/cm 相比，注入电压为 75V/cm 时分辨率最高。更高的注入电压（高于 75V/cm）不仅增加初始 DNA 带宽，且导致峰前拖尾。这种现象的产生是由于：DNA 片段在样品缓冲液和分离介质交界处过量堆积。注入电压过高，注入时间过长，将导致在施加工作电压前一些 DNA 片段被导入分离介质。带宽增加，峰型畸变，会降低分离效果。注入电压较低，能缩短初始带宽，从而提高分辨率。但是，若电压过低，信号噪声比将会降低。注入时间间隔对 DNA 分离的影响方式同注入电压。

[0162] 在 75V/cm 下，注入时间 10s，分离效果最好（未给出数据）。注入电压和注入时间间隔与初始 DNA 带宽紧密相关。当其它工作条件，如柱长、温度、和工作电场强度保持不变时，存在一个最佳组合。

[0163] 另一个对 DNA 分离具有很大影响的参数是柱长。图 15 示出有效柱长为 40cm 和 35cm 时分辨率的变化。40cm 的柱长比 35cm 的柱长分辨率更高。在用 CE 进行 DNA 序列测定分析中，13cm 到 60cm 的柱长已与不同分离介质一起被使用。一般说来，存在一个最小柱长；柱长比最小柱长更小，则不能获得令人满意的分离；柱长较长通常会导致 DNA 读长更长，但是工作时间短；通过降低柱长可实现快速分离，但同时降低了 DNA 的读长和分辨率。

[0164] 工作电场强度影响到 DNA 测序的速度、读长和分辨率。图 16 是在工作电场强度为 200V/cm 和 150V/cm 时，在 581 个碱基后 pGEM3Zf(+) (C-mix) 的电泳图。和较高的工作电场强度（200V/cm）相比，较低的工作电场强度（150V/cm）使得 DNA 读长更长、分辨率更高和迁移时间更长。

[0165] 温度影响 DNA 分离。一般地，柱温适当增加（低于 50℃），会提高分离效果和分离速度，这也有助于 DNA 大片段的分离。当使用 LPA 和 PDMA 构成的类互穿网络作为 DNA 分离介质时，能观察到非常相近的结果（数据未给出）。

[0166] LPA 与 PDMA 比率的影响

[0167] 图 17 示出了 DNA 测序样品的分离，该分离是使用 LPA 与 PDMA 比率为 1.62 : 1, 3.33 : 1, 6.33 : 1, 和 10.9 : 1 的类互穿网络作为分离介质。在无涂层的毛细管中，将分子量为 6.4×10^6 g/mol 的 LPA 作为 DNA 分离介质，分离效能非常差，如图 17a 所示。通过添加非常少量的 PDMA 形成类互穿网络可以显著提高分离效果，如图 17e 所示，其中，LPA 与 PDMA 比率为 10.89 : 1。但是，PDMA 量的进一步增加会削弱分离效果。如图 17b-d 所示，当 LPA 与 PDMA 比率从 6.33 : 1 降到 1.62 : 1 时，分离分辨率相应降低。

[0168] 在图 17 中，LPA 的分子量非常高（ 6.4×10^6 g/mol）。含少量 PDMA（LPA : PDMA 为 10.9 : 1）的类互穿网络的形成在没有相分离的情况下优化了该网络。另外，PDMA 提供了足够强的动态涂布能力，能抑制电渗流。PDMA 含量增加（LPA : PDMA 为 6.33 : 1）会导致分离效能更差。并且，PDMA 含量进一步增加会引起微相分离，这会破坏类互穿网络的性能，如图 17b 和 17c 所示。

[0169] LPA 分子量的影响

[0170] 为了开发适用于 DNA 测序分析的类互穿网络，使用分子量尽可能高的 LPA 来形成主要骨架，然后将少量 PDMA 单体聚合，以优化类互穿网络的形成并提供动态涂布能力。图

18 示出了 LPA 分子量对 DNA 分离的影响。当保持 LPA :PDMA 比率几乎不变并且较低（小于 10 : 1 以保持 LPA 和 PDMA 的相容性）时，LPA 的分子量越高，分辨率越好并且读长越长。由大尺寸的 LPA 形成的类互穿网络的主要骨架提供了几乎所有的筛选能力。互穿 PDMA 链的存在扩展了 LPA 链，并且，使得分离介质更有效。

[0171] LPA 分子量分布的影响

[0172] 如图 18 所示，类互穿网络中更高的 LPA 分子量会产生更好的分辨率和更长的 DNA 读长。为了增加 LPA 的分子量，可以采用不同的合成方法。在一种方法中，采用无乳化剂的方案来聚合 LPA（样品 A0，表 1）。在另一种方法中，采用反相微乳液聚合的方案来聚合 LPA（样品 A4，表 1）。用两种方法都成功合成了片段大于 9×10^6 的高分子量 LPA。这样的 LPA 用于形成具有类似量的 PDMA 的类互穿网络，其在 DNA 分离中的性能如图 19 所示。用反相微乳液聚合法合成的 LPA 在同 PDMA（图 19b）形成类互穿网络后，分离能效更佳。所有的其它条件，如 LPA 分子量、LPA :PDMA 比率和形成类互穿网络的方法，几乎相同。

[0173] 优化条件下的 DNA 测序

[0174] 为了提高 DNA 分离的处理量，读长较长的快速分离是一个很实用的方法。采用下面的工作条件：有效柱长为 34m，工作电压为 225V/cm，在 75V/cm 进行 DNA 注入，时间是 8s，温度为 45℃。类互穿网络具有如下参数：2.5w/v %（LPA 的 M_v 是 4.53×10^6 g/mol），LPA/PDMA 比率为 10.81 : 1。使用 Fam 标记的 -21M13 引物在 pGEM-3Zf(+) 模板上形成 C 端单染料标记的 DNA 序列测定片段的电泳谱图，如图 15 所示。在室温下，能实现高达 617 个碱基时，单个碱基分辨率为 0.63，高达 ~ 1000 个碱基时单碱基分辨率为 0.3。值得注意的是，操作温度越高（>50℃），具有相当的分辨率所需的工作时间越短。

[0175] 实施例 3

[0176] 在 LPA 中聚合 PDMA 以生成类互穿网络

[0177] (a) 样品制备：

[0178] 采用反相微乳液聚合法将已纯化的丙烯酰胺单体聚合成 LPA。在 LPA 主要骨架中将二甲基丙烯酰胺单体进行自由基聚合，形成类互穿网络。

[0179] (b) 激光散射用溶液的制备：

[0180] 配制两种溶于 $1 \times$ TTE 缓冲溶液中，浓度分别为 7.77×10^{-2} g/ml 和 1.20×10^{-2} g/ml 的 LPA 和类互穿网络的储备溶液。将该储备溶液保存在 50ml 的容量瓶中，在慢速摇动混合器上振荡至少 7 到 10 天，以制备均一的溶液。通过稀释储备溶液制备用于光散射检测的，指定浓度的六种 LPA 溶液和五种类互穿网络溶液。将每种稀释液通过离心（7700g（-8000rpm），6h）净化。上层无尘溶液用来检测该溶液光散射的特征。

[0181] (c) 光散射检测：

[0182] 在散射角为 15° 到 139° 、温度 25℃ 下，使用实验室自制激光散射分光计进行静态和动态光散射检测。在 532nm 波长处激光输出功率为 ~ 500mW。利用 Brookhaven Instruments B 19000 数字相关仪测定在散射角为 30° 、 35° 、 40° 、 50° 、 60° 、 70° 和 90° 时的强度 - 强度自相关函数。

[0183] 图 1 和图 2 分别示出了 LPA 和类互穿网络的静态光散射结果。图 3 和图 4 分别示出了 LPA 和类互穿网络的动态光散射结果。图 3 出现两个峰，其中一个是在 $R_h \sim 15$ nm 处的微小峰，而另一个是在 $R_h \sim 80$ nm 处的主峰。对类互穿网络而言，该微小尺寸的成分可在

澄清过程中去除。但是,该微小峰的存在可能是 LPA 的聚合过程的指示,其中可能涉及分子链增长的两个独立步骤。开始步骤中形成较小尺寸的分子链,后续步骤中形成较大尺寸的分子链。

[0184] (d) 毛细管电泳

[0185] 类互穿网络分离介质的制备:

[0186] 在一个 5ml 小瓶中,将干燥的类互穿网络溶解在 $1\times\text{TTE}+7\text{M}$ 尿素缓冲溶液中。总溶液体积一般少于 2ml,并且聚合物浓度约为 2-2.5% g/ml。通过静置过夜,使干燥样品溶胀成凝胶状溶液后,在旋涡混合器上将该凝胶状溶液彻底混合 20s,每天两次,直到聚合物全部溶解。至少要花 3-4 天时间来制备其均一溶液。在使用之前,(聚合物溶液)分离介质要进行离心,以除去气泡。

[0187] (e) CE 电泳:

[0188] 三种用于 CE 检测的不同仪器:

[0189] (i) 实验室自制的具有水冷却的氩离子激光器的激光诱导荧光检测器, $\lambda = 488\text{nm}$,其用于单染料 [FAM] 标记的引物和 C 端混合 DNA (pGEM-3Zf(+)) 从 -21M13 上游引物) 的 DNA 测序分析。

[0190] 在图 5 中,测序分析数据表明:具有单个碱基分辨率(仅用肉眼)的 1000 个碱基的分离可在 30min 内完成。

[0191] 用于 DNA 分离的类互穿网络与各种聚合物介质的商业产品的比较

[0192] 图 6 示出了 DNA (pGEM-3Zf(+)) 从 -21M13 上游引物) 测序分析数据。根据 Amersham Biosciences 公司推荐,在 44°C 和 $150\text{V}/\text{cm}$ 下, MegaBACE LPA 凝胶/ $1\times\text{MegaBACE}$ 缓冲液中进行毛细管电泳。图 7 示出了相同 DNA 的测序分析数据,但是是在 50°C 和 $200\text{V}/\text{cm}$ 下,在介质 POP-6 (Applied Biosystems)/ $1\times\text{TTE}$ 缓冲液中进行 CE,这是 POP6 的 CE 常规工作条件。

[0193] 作为对比,可将 800b 的 DNA 样品的迁移时间作为分离的速度标准,利用类互穿网络作为分离介质的分离可在 $26.3\text{min}(t_{800,\text{IPN}})$ 内完成(图 5),而利用 MegaBACE LPA 凝胶作为分离介质的分离在 $89\text{min}(t_{800,\text{LPA}})$ 内才能完成(图 6)。

[0194] 在类互穿网络介质中 DNA 的分离速度比在 MegaBACE LPA 凝胶中 DNA 的分离速度快约 3 倍。在 POP6 介质中的 DNA 分离不能达到 800b(图 7)。如果 590b 的迁移时间可用作 DNA 分离的速度标准,那么使用类互穿网络、MegaBACE LPA 和 POP6 作为分离介质的迁移时间分别是 $t_{590,\text{IPN}} \sim 22\text{min}$, $t_{590,\text{LPA}} \sim 70.5\text{min}$ 和 $t_{590,\text{POP6}} \sim 89\text{min}$ 。在类互穿网络中 590bpDNA 的分离所需的时间仅是在 MegaBACE LPA 中所需时间的三分之一,在 POP6 中所需时间的四分之一。

[0195] ABI310 遗传分析仪是一种自动化的单毛细管遗传分析仪,其被设计并被优化,以支持宽范围的测序和片段分析应用。用 BigDyeTerminator v3.0 标准 DNA 来表明测序分析性能。

[0196] 图 8 示出了 BigDye v3.0 的电泳分离的末端部分(碱基数从 600 到 ~ 1000)。在 ABI310 上,使用经表征的类互穿网络介质,能在 36min 内完成四色 BigDye v3.0DNA 的 1000 个碱基的分离。

[0197] 图 9 示出了利用 POP6 介质和 Module seq POP6(1mL)E 对 BigDye v3.0 进行电泳分离的蓝色 -G 部分。860b($t_{860,\text{POP6}}$) 的迁移时间是 $\sim 61.5\text{min}$,是利用类互穿网络分离介质

的 860b ($t_{860, \text{IPN}}$) 的迁移时间 $\sim 32\text{min}$ 的 1.9 倍 (图 8)。ABI310 不能使用 MagBACE LPA 凝胶, 因为该凝胶粘滞度高, 而 ABI310 的泵压不足以进行检测。

[0198] 当类互穿网络用作分离介质时, 肉眼能从电泳分离数据中读取长的碱基识别 (long base-call) (1007b) (图 8), 而当 POP6 用作分离介质时, 肉眼只能读取 860b (图 9)。

[0199] 实验室自制的具有硅雪崩光电二极管的激光诱导的荧光 (四色) 检测器 (Perkin Elmer Model SPCM-AQR-12-FC) 可用以对 BigDye Terminator v3.0 进行序列分析。该检测器由 Stony Brook 的 SUNY 工程学院 (Engineering College) 制备。作为对比, CE 在类互穿网络和 Applied Biosystems 公司的新产品 POP7 的不同的介质中进行。

[0200] 在图 10 中, DNA (BigDye Terminator v3.0) 的碱基识别数据表明: 在 60°C 和 $304\text{V}/\text{cm}$ 下, 当 CE 在类互穿网络 / $1\times\text{ABI}$ 缓冲液中进行时, 具有单碱基分辨率的 600 碱基的分离能在 $\sim 30.4\text{min}$ ($t_{600, \text{IPN}}$) 内完成。毛细管有效长度为 50cm , 毛细管 $\text{ID}/\text{OD} = 50/361 (\mu\text{m})$ 。但是, 当 POP7 / $1\times\text{ABI}$ 缓冲液作为分离介质时, 在 60°C 和 $196\text{V}/\text{cm}$ 下, 对相同 DNA 的 600 个碱基的分离获得的最好分离结果是在 $\sim 63.3\text{min}$ ($t_{600, \text{POP7}}$) 内。毛细管有效长度和 ID/OD 的比率分别是相同的, 在 50cm 和 $50/361 (\mu\text{m})$ 。图 11 是碱基识别数据。在类互穿网络介质中, 分离具有单碱基分辨率的 600b 的 DNA 分离所需的时间比在 POP7 中所需时间少一半。(仪器和碱基识别软件由 StonyBrook 的 SUNY 工程学院提供。)

[0201] 实施例 4

[0202] 形成类互穿网络的溶液混合方法

[0203] 分别配制两种不同聚合物的稀释溶液。这两种聚合物溶液逐渐混合到一起, 以形成具有指定浓度和聚合物组分的组成的均一溶液混合物。

[0204] LPA 和 PDMA 是部分相容的聚合物对。为制备 CE 检测用分离介质, 通过使用溶液混合方法制成均一的 LPA 和 PDMA 溶液混合物。分别配制 LPA / 缓冲剂溶液和 PDMA / 缓冲剂溶液。将 LPA ($M_w = 7.62 \times 10^6 \text{g/mol}$) 溶解在 $1\times\text{TTE}+7\text{M}$ 尿素缓冲液中, 以配制成 $2.57\% \text{g/ml}$ 的溶液。将 PDMA ($M_w = 470\text{Kg/mol}$) 溶解在 $1\times\text{TTE}+7\text{M}$ 尿素缓冲液中, 以配制成 $1.61\% \text{g/mL}$ 的溶液。在每种聚合物在其自身的缓冲剂中完全溶解后, 以 $100 \mu\text{l}$ 等分量将 $300 \mu\text{l}$ PDMA 溶液逐步加入 0.9ml LPA 溶液中。在每次添加 PDMA 溶液后, 将溶液混合物在旋涡混合器上混合 20s 。溶液混合物中 LPA 和 PDMA 的含量分别是 83% 和 17% 。值得注意的: 在 PDMA 分子量为 470K 时, 浓度 $1.61\% \text{g/mL}$ 已高于其 C^* 值。

[0205] 图 12 示出了利用根据实施例 3 制备的 LPA/PDMA 类互穿网络作为分离介质的 CE 结果。作为对比, 图 13 示出了利用根据实施例 2 制备的类互穿网络作为分离介质的 CE 结果。在同样工作条件下, 两种分离介质的 DNA 分离结果非常相近。电泳在工作电场为 $195.5\text{V}/\text{cm}$ 下进行, 并且 DNA 注入时间为在 $27\text{V}/\text{cm}$ 时 20s 。

[0206] 实施例 5

[0207] 一种生成类互穿网络的溶液混合方法

[0208] 原材料包括分子量约 7M 的 LPA; 和分子量约 0.5M 的 PDMA。采用如下所示的几种不同方法配制最终总浓度为 $2 \sim 2.5\text{-wt}\%$ ($0.02 \sim 0.025\text{g/mL}$) 的混合溶液。

[0209] A) 配制 LPA/PDMA 的浓度比 ($\text{wt}\%$) 为 $1.6/1$ 的溶液。LPA 溶液的浓度为 0.0257g/mL , PDMA 溶液的浓度为 0.016g/mL 。采用下述各方式混合最终总浓度为 $2 \sim 2.5\text{wt}\%$ 的混合溶液。

[0210]

最终溶液的 LPA/PDMA 组成比 (wt %)	混合前 LPA/PDMA 溶液的体积比	混合后的总体积*
2/1	1.2/1	2.2 单位
6/1	3.5/1	4.5 单位
10/1	6.5/1	7.5 单位

[0211] * 假设体积和体积单位不变。

[0212] B) 配制 LPA/PDMA 的浓度比 (wt %) 为 2/1 的溶液, 其中 LPA 溶液的浓度为 0.028g/ml, PDMA 溶液的浓度为 0.014g/ml。采用下列各方式混合最终总浓度为 2 ~ 2.5wt % 的混合溶液。

[0213]

最终溶液的 LPA/PDMA 组成比 (wt %)	混合前 LPA/PDMA 溶液的体积比	混合后的总体积*
2/1	1/1	2 单位
6/1	2.8/1	3.8 单位
10/1	5/1	6.0 单位

[0214] * 假设体积和体积单位不变。

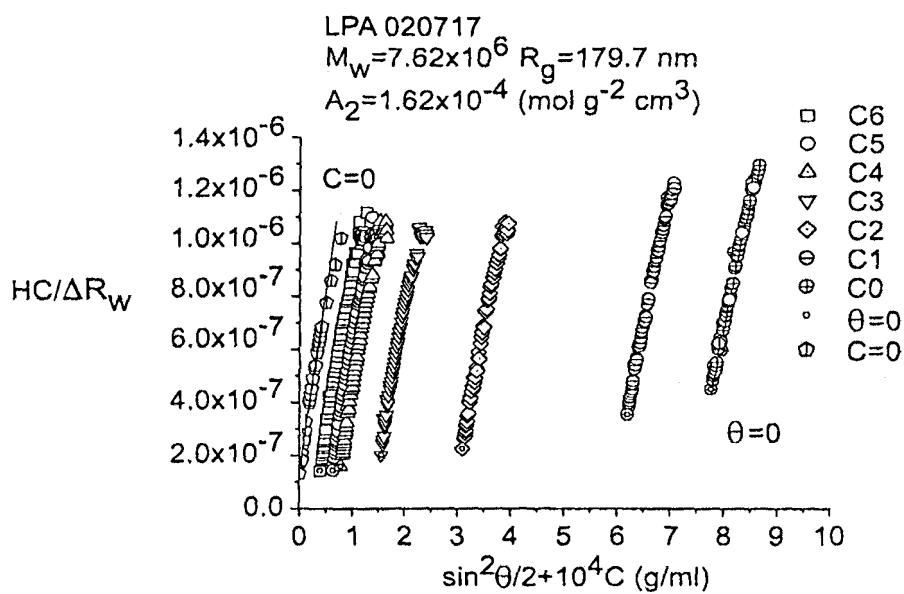


图 1

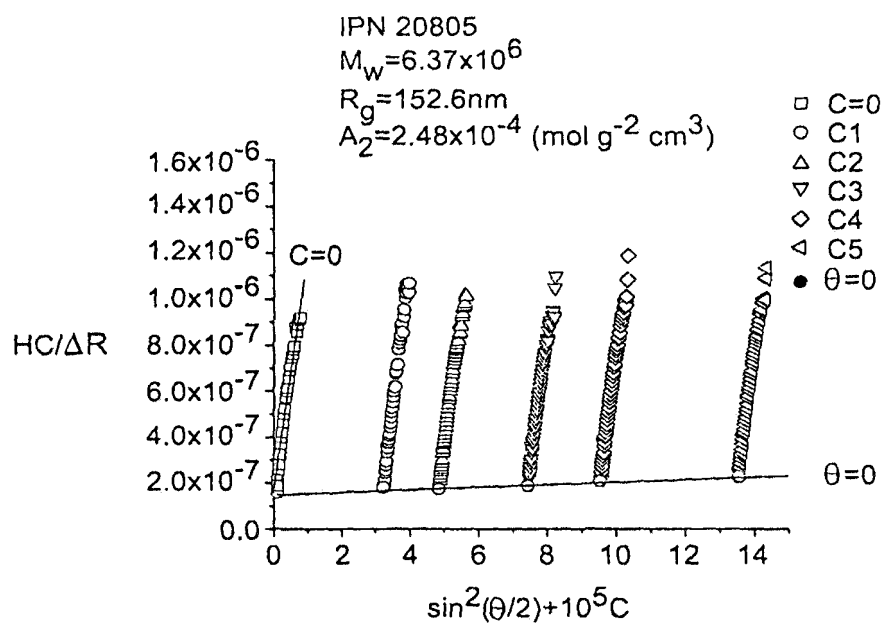


图 2

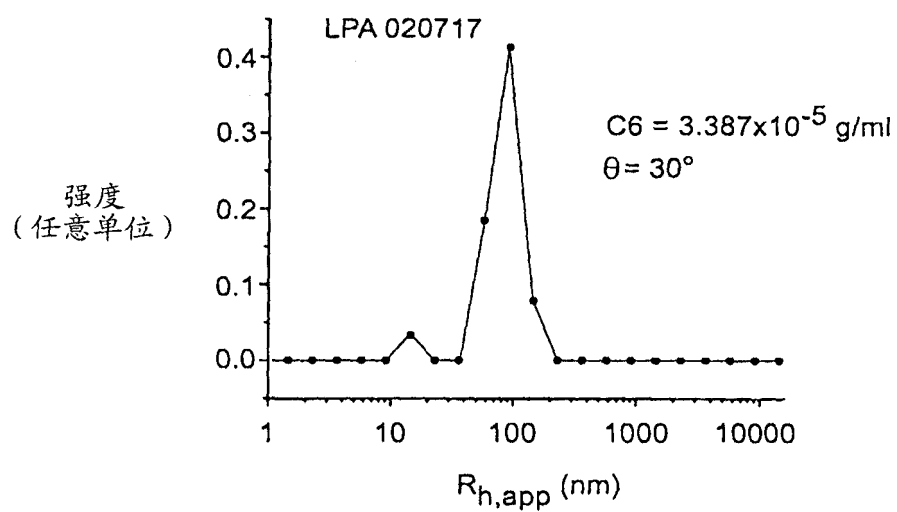


图 3

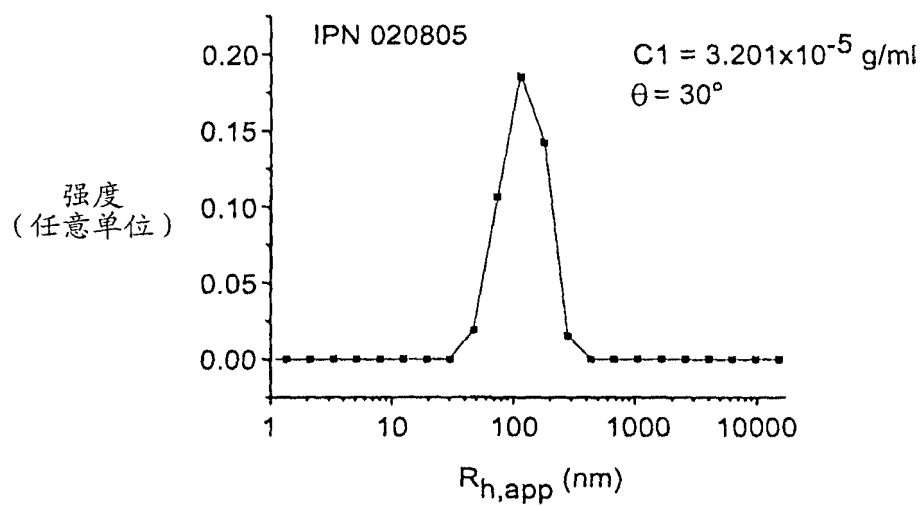


图 4

020604-2.0%; DNA: pGEM-3Zf(+) 从 -21 M13 上游引物;
毛细管: 34/42cm; 注入: 75V/cm, 8s;
工作: 225 V/cm; 缓冲剂: 1xTTE+7M 尿素; 温度: 60°C

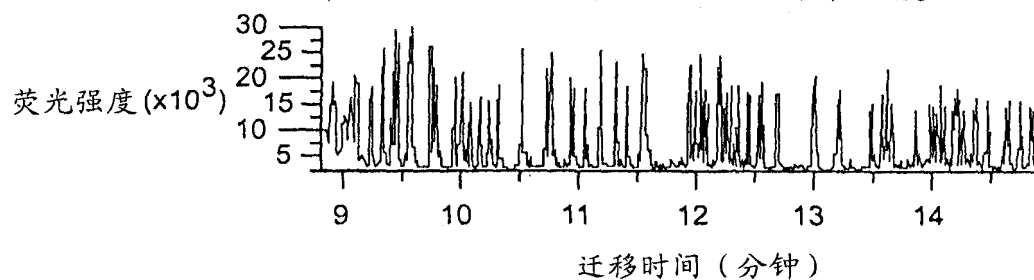


图 5A

020604-2.0%; DNA: pGEM-3Zf(+) 从 -21 M13 上游引物;
毛细管: 34/42cm; 注入: 75V/cm, 8s;
工作: 225 V/cm; 缓冲剂: 1xTTE+7M 尿素; 温度: 60°C

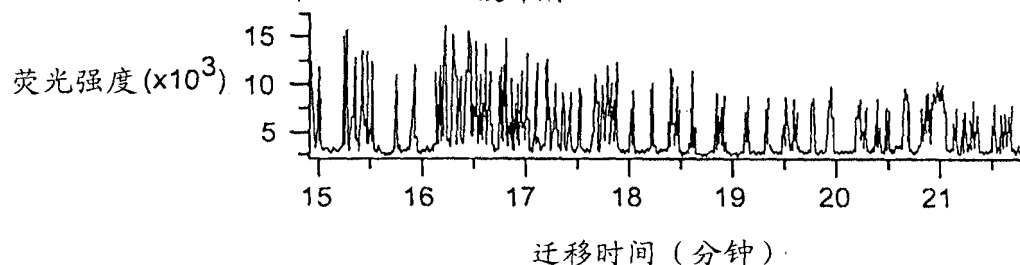


图 5B

020604-2.0%; DNA: pGEM-3Zf(+) 从 -21 M13 上游引物;
毛细管: 34/42cm; 注入: 75V/cm, 8s;
工作: 225 V/cm; 缓冲剂: 1xTTE+7M 尿素; 温度: 60°C

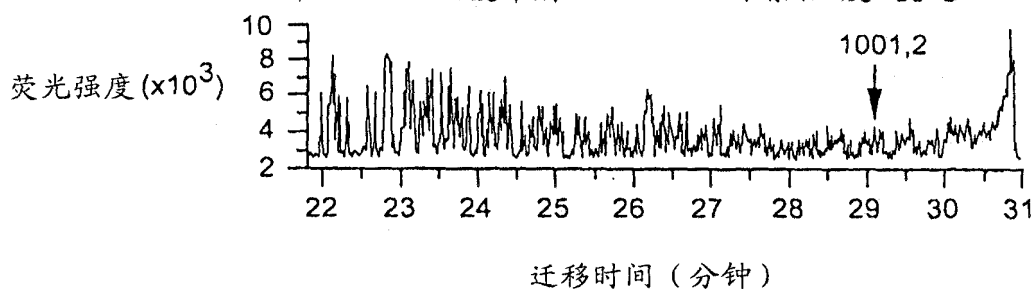


图 5C

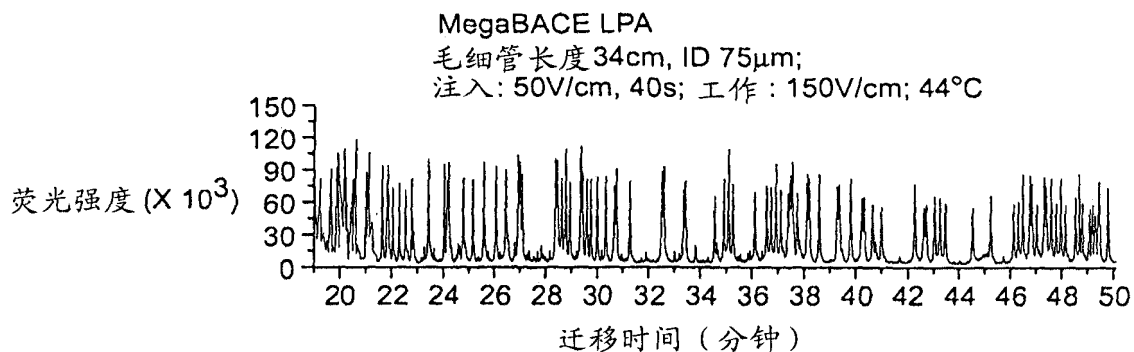


图 6A

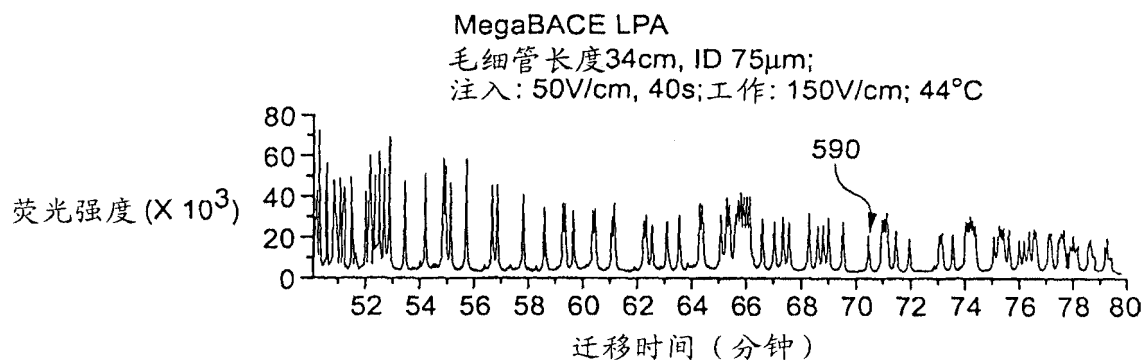


图 6B

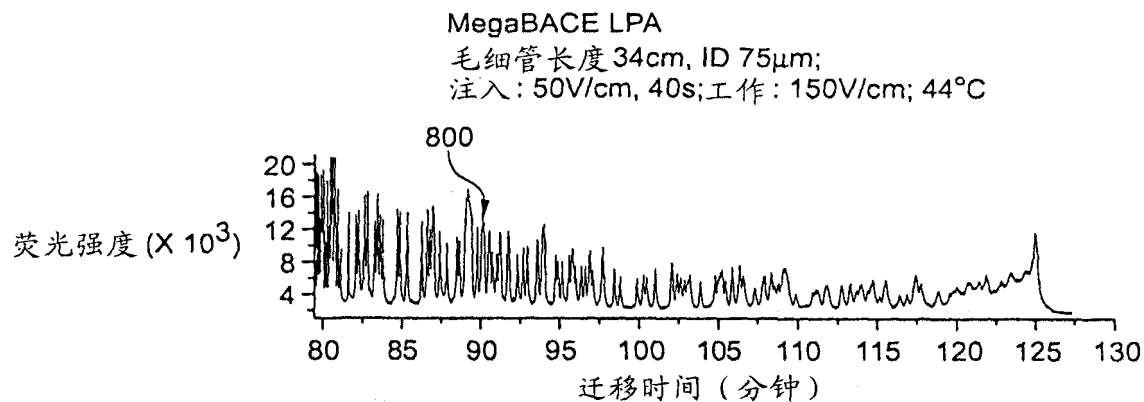


图 6C

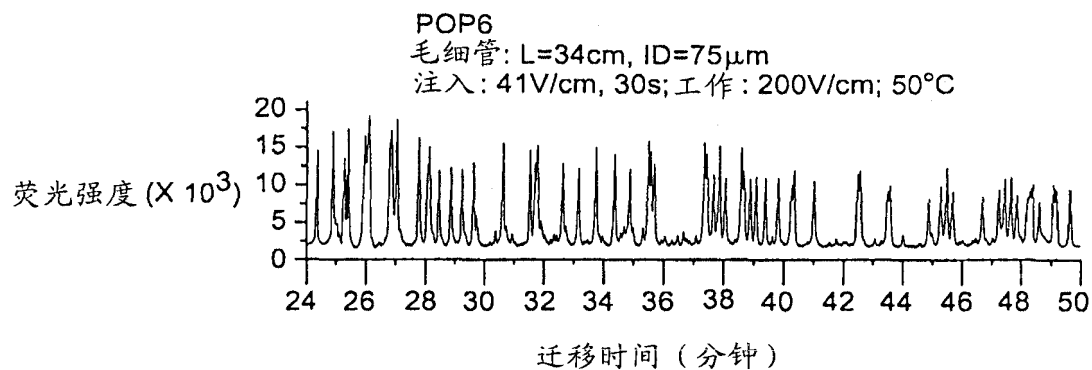


图 7A

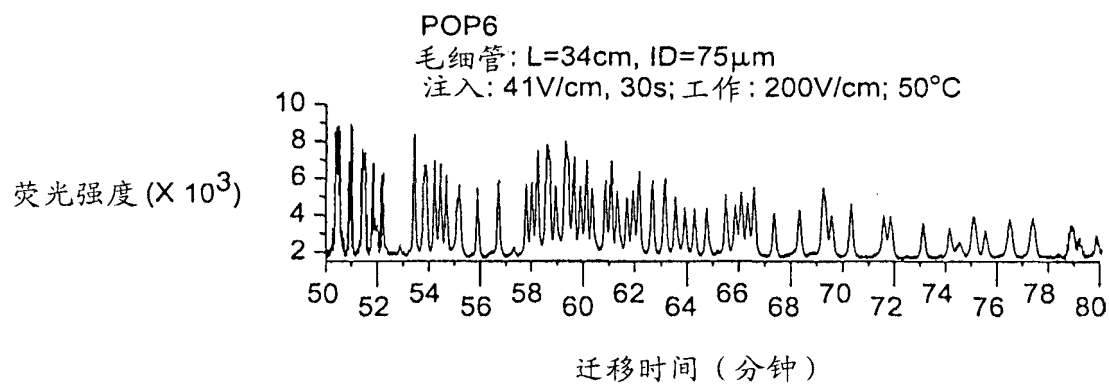


图 7B

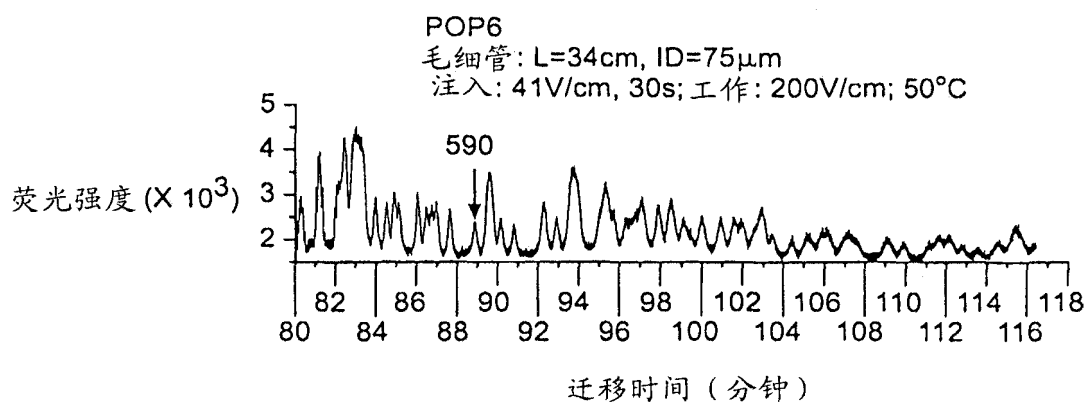


图 7C

BigDye Terminator v3.0

注入电压 / 时间: 47.6 V/cm 15 sec.

工作电压/cm: 200 V/cm

毛细管长度: 31 cm, ID/OD = 49/361 μm

温度: 60 C

工作缓冲剂: 1xTTE+7M 尿素

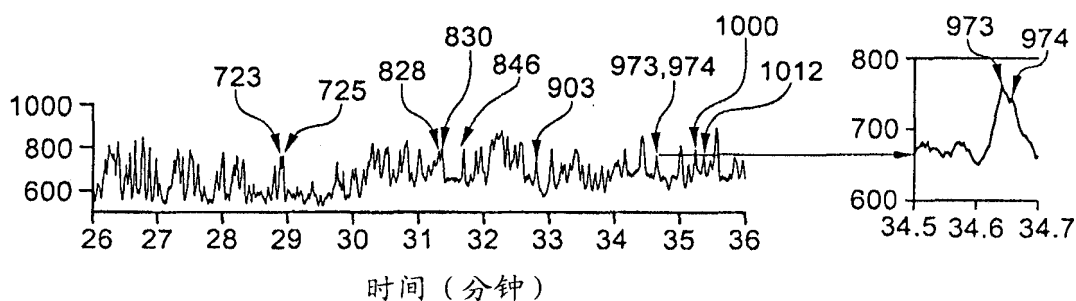


图 8A

BigDye Terminator v3.0

注入电压 / 时间: 47.6 V/cm 15 sec.

工作电压/cm: 200 V/cm

毛细管长度: 31 cm, ID/OD = 49/361 μm

温度: 60 C

工作缓冲剂: 1xTTE+7M 尿素

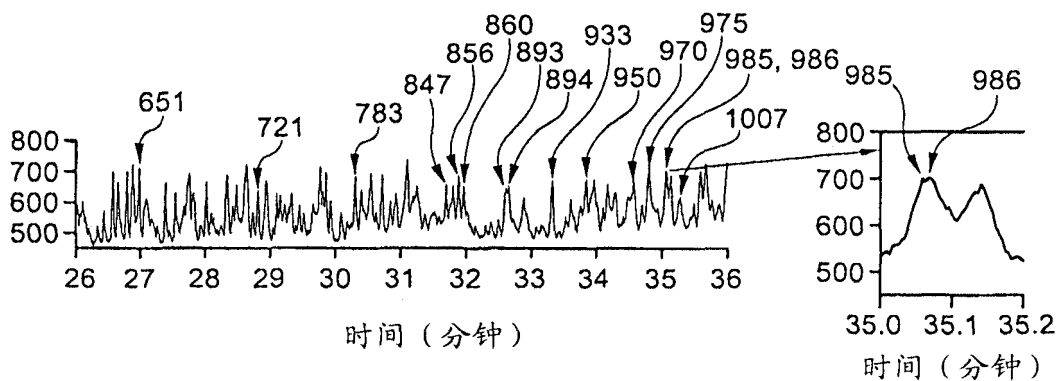


图 8B

BigDye Terminator v3.0

注入电压 / 时间: 47.6 V/cm 15 sec.

工作电压/cm: 200 V/cm

毛细管长度: 31 cm, ID/OD = 49/361 μm

温度: 60 C

工作缓冲剂: 1xTTE+7M 尿素

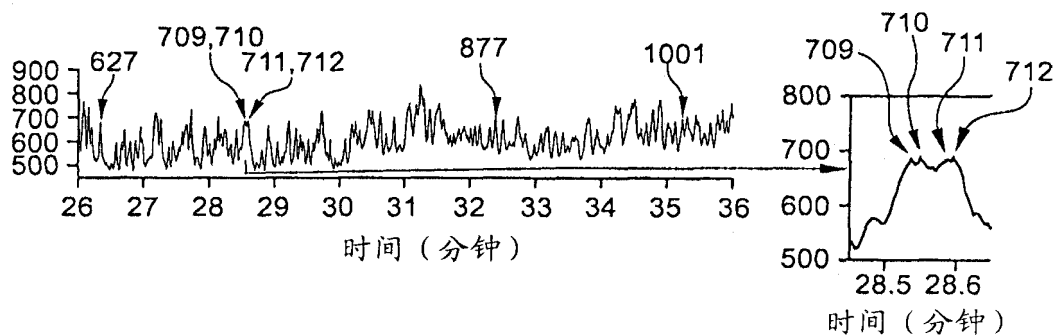


图 8C

BigDye Terminator v3.0

注入电压 / 时间: 47.6 V/cm 15 sec.

工作电压/cm: 200 V/cm

毛细管长度: 31 cm, ID/OD = 49/361 μm

温度: 60 C

工作缓冲剂: 1xTTE+7M 尿素

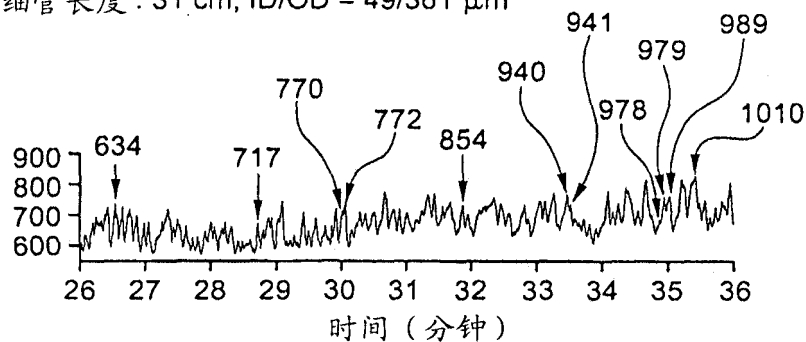


图 8D

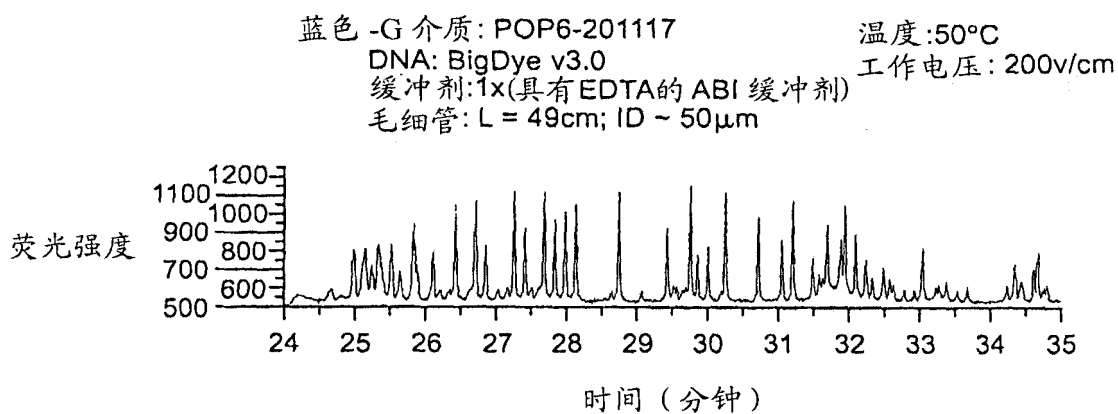


图 9A

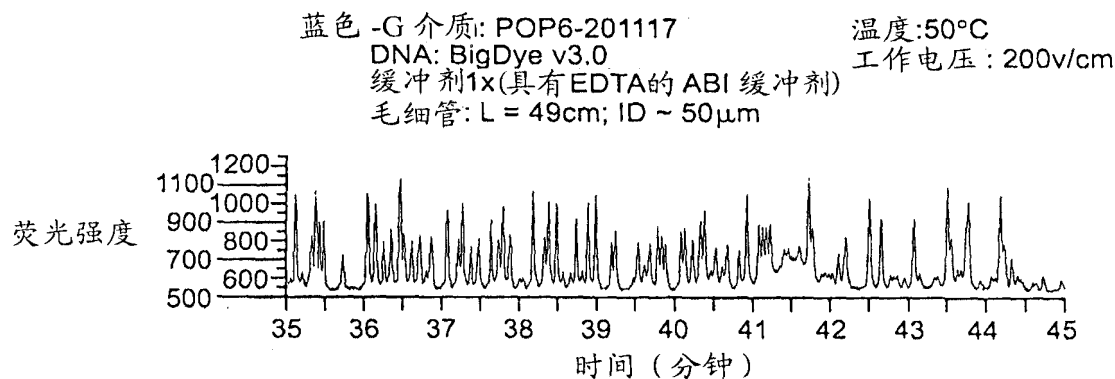


图 9B

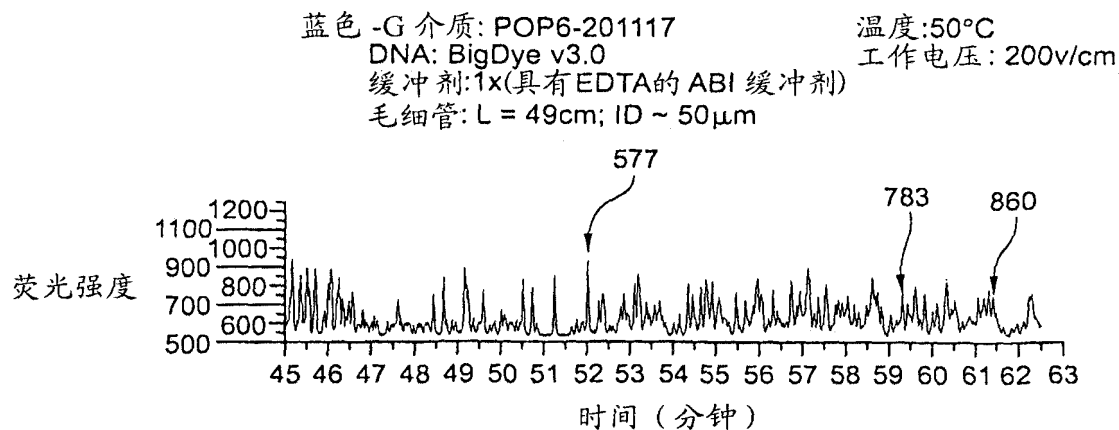


图 9C

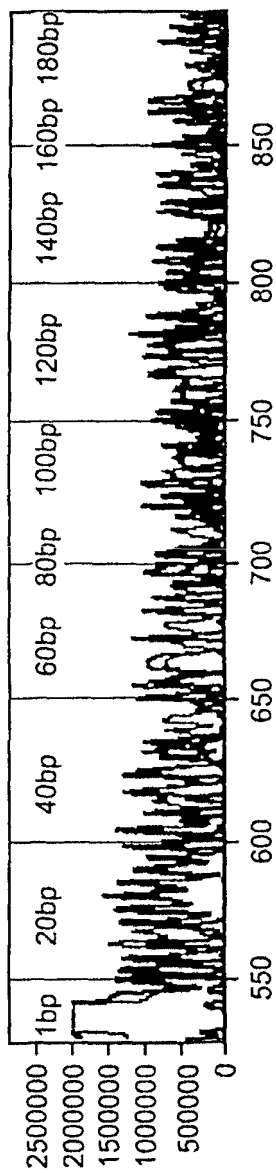


图 10A

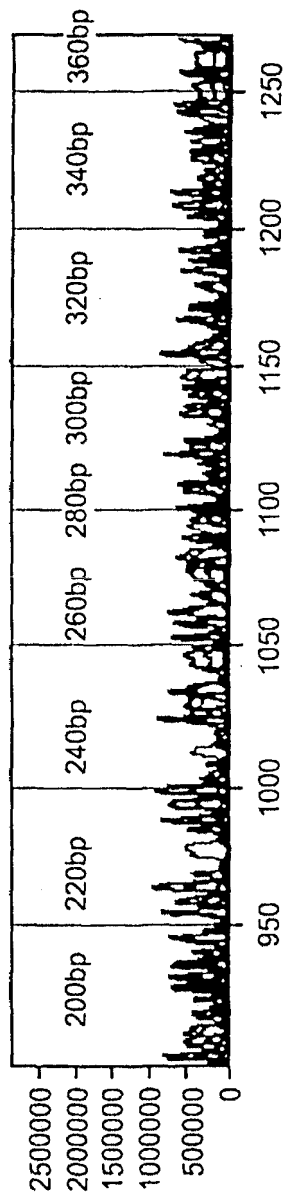


图 10B

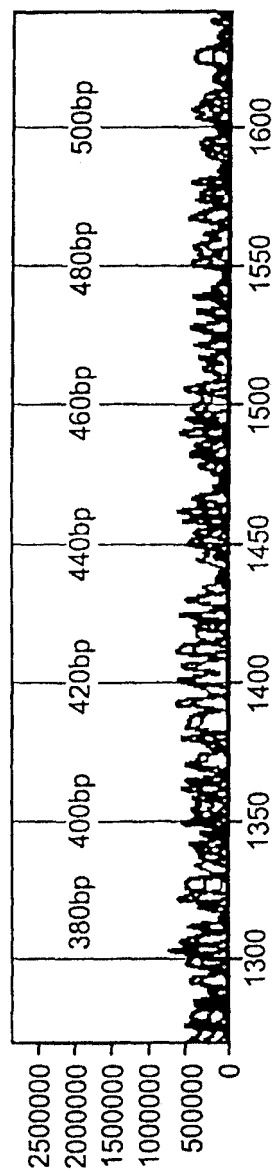


图 10C

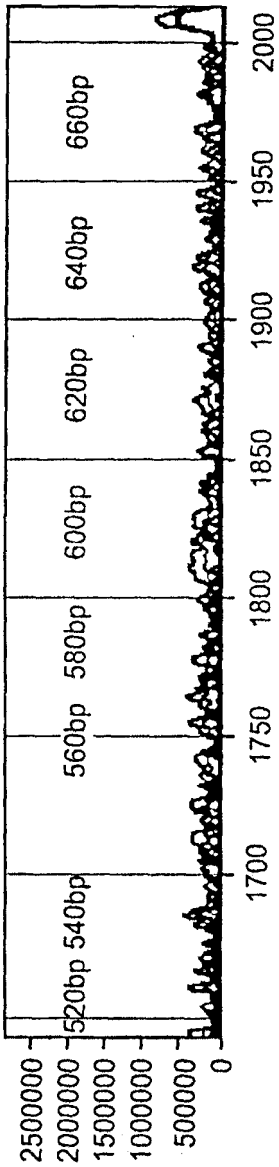


图 10D

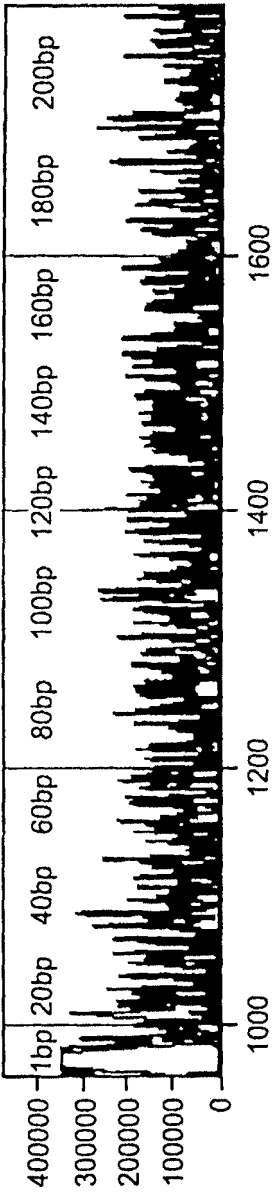


图 11A

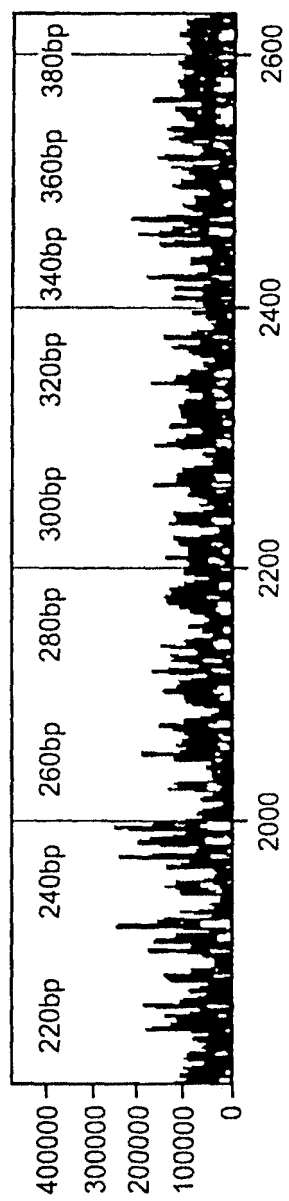


图 11B

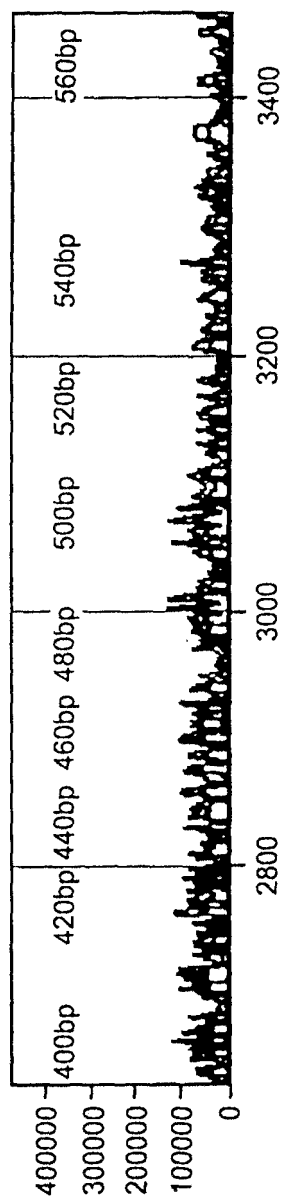


图 11C

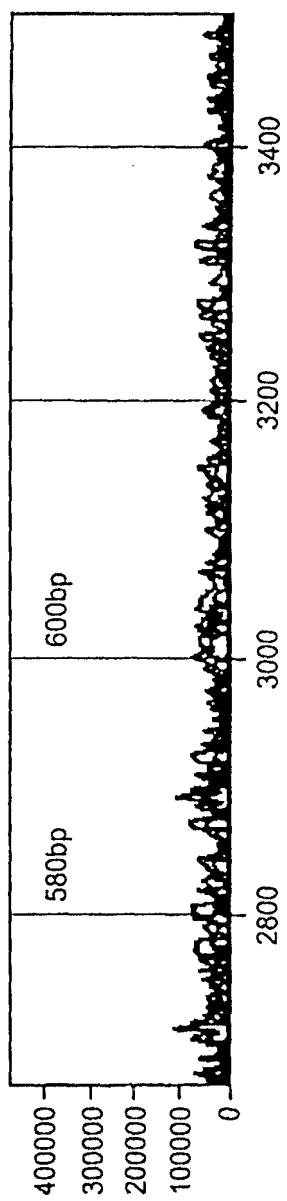


图 11D

MPN- 蓝色 -G 工作电压 /cm: 195.5 V/cm
注入电压 /cm: 27 V/cm
60°C, 毛细管长度: 33cm; ID/OD: 50/361 μm

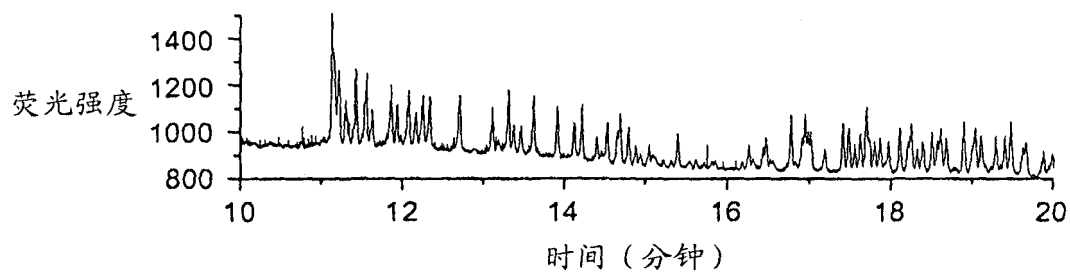


图 12A

MPN- 蓝色 -G 工作电压 /cm: 195.5 V/cm
注入电压 /cm: 27 V/cm
60°C, 毛细管长度: 33cm; ID/OD: 50/361 μm

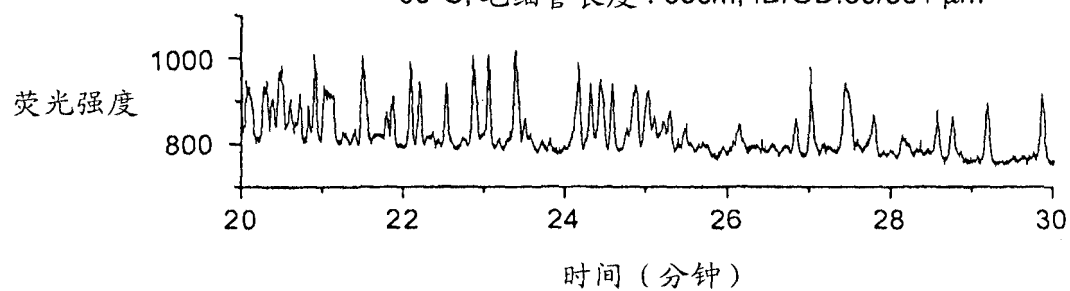


图 12B

MPN- 蓝色 -G 工作电压 /cm: 195.5 V/cm
注入电压 /cm: 27 V/cm
60°C, 毛细管长度: 33cm; ID/OD: 50/361 μm

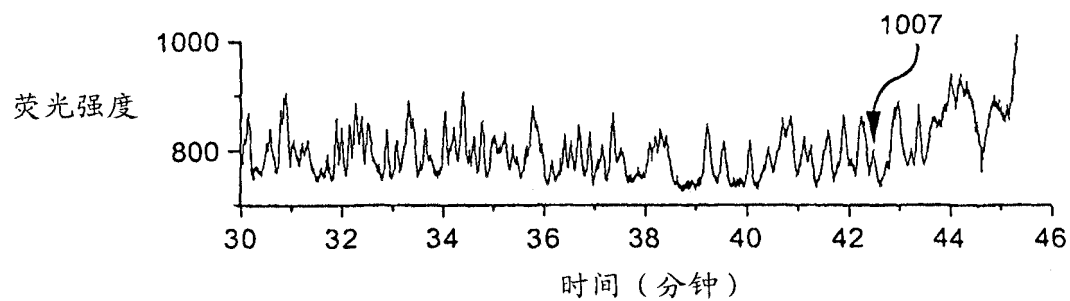


图 12C

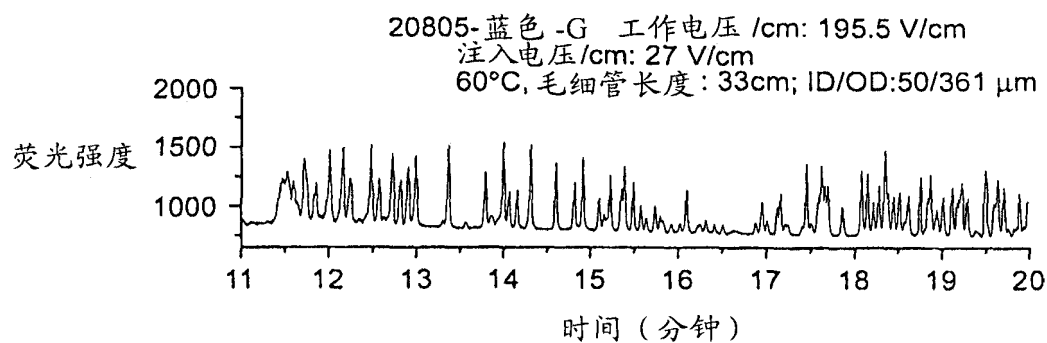


图 13A

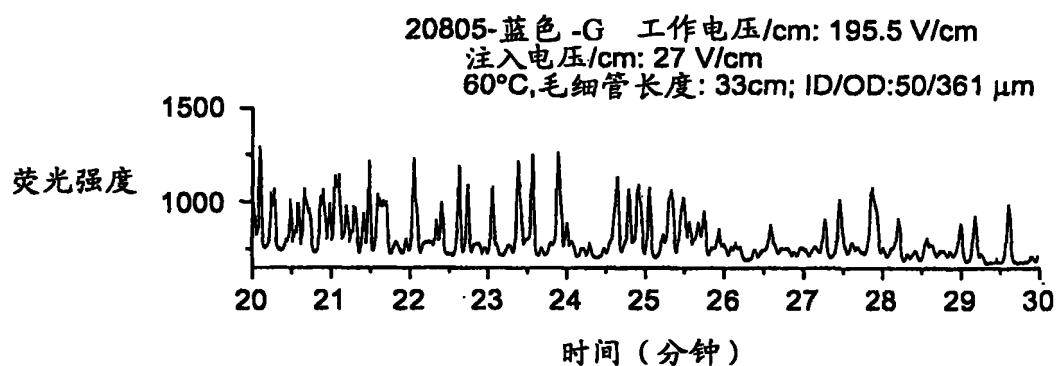


图 13B

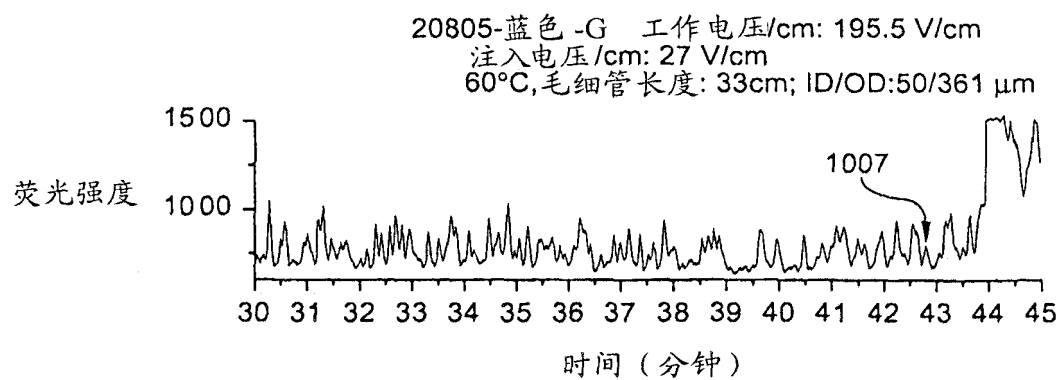


图 13C

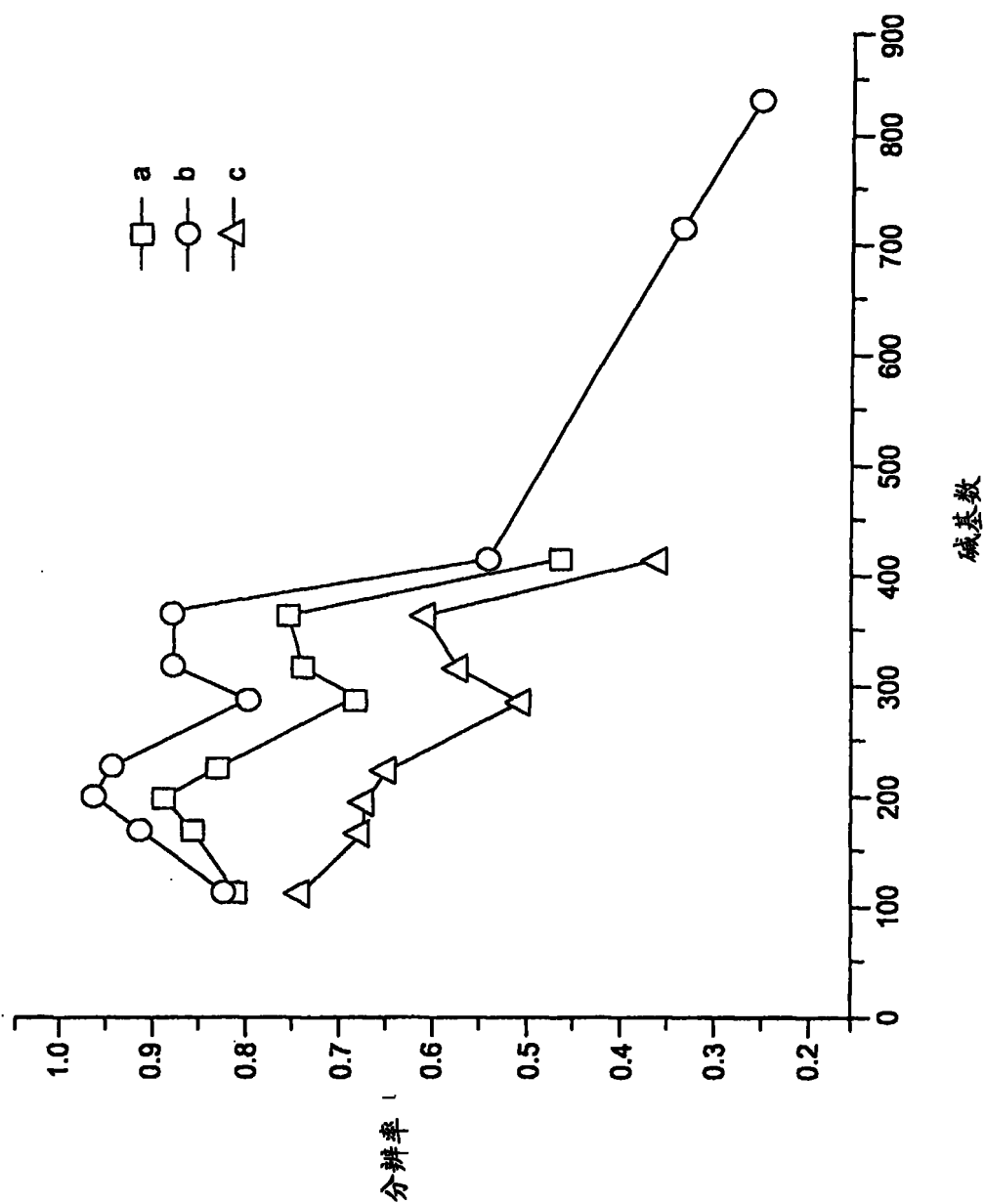


图 14

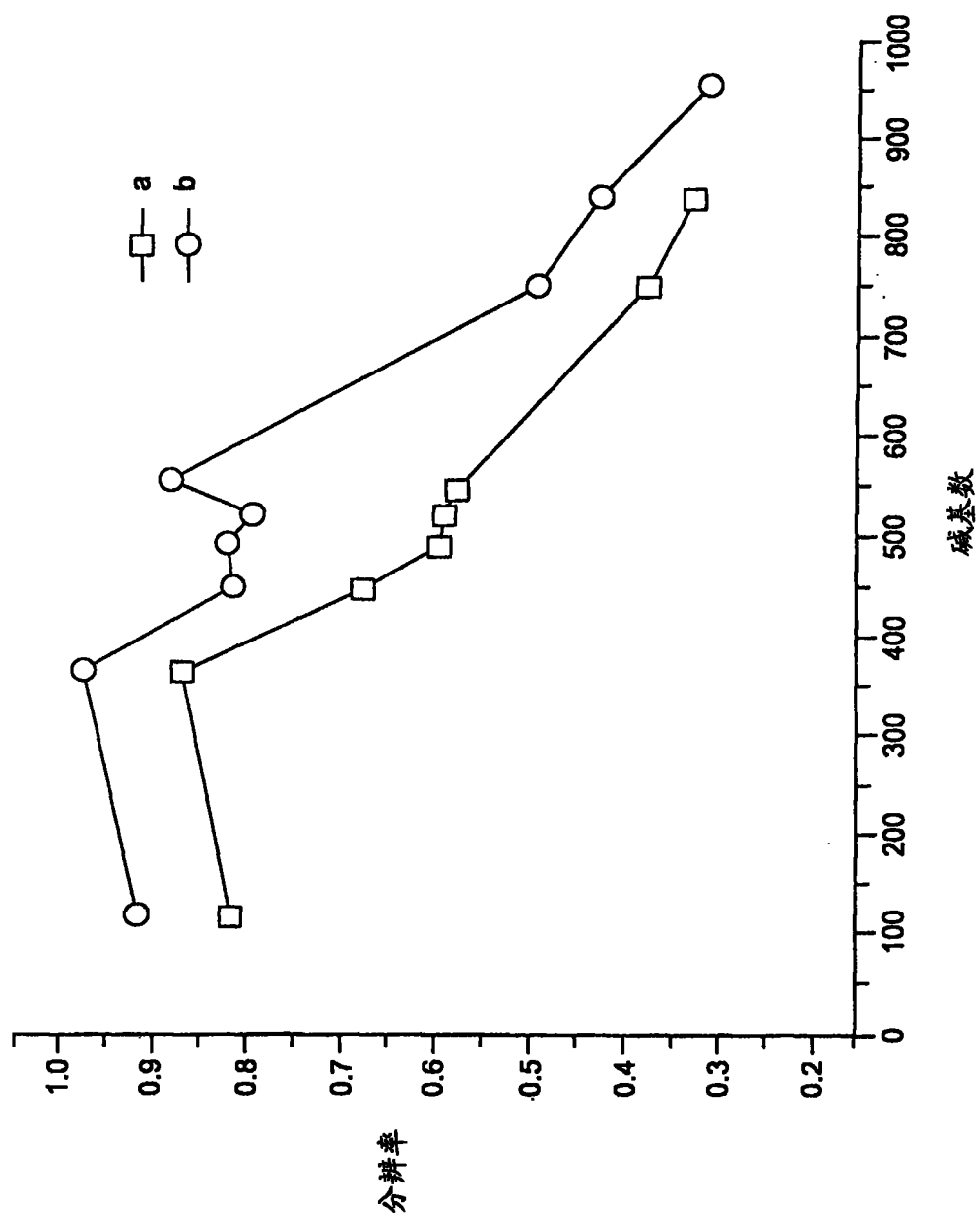


图 15

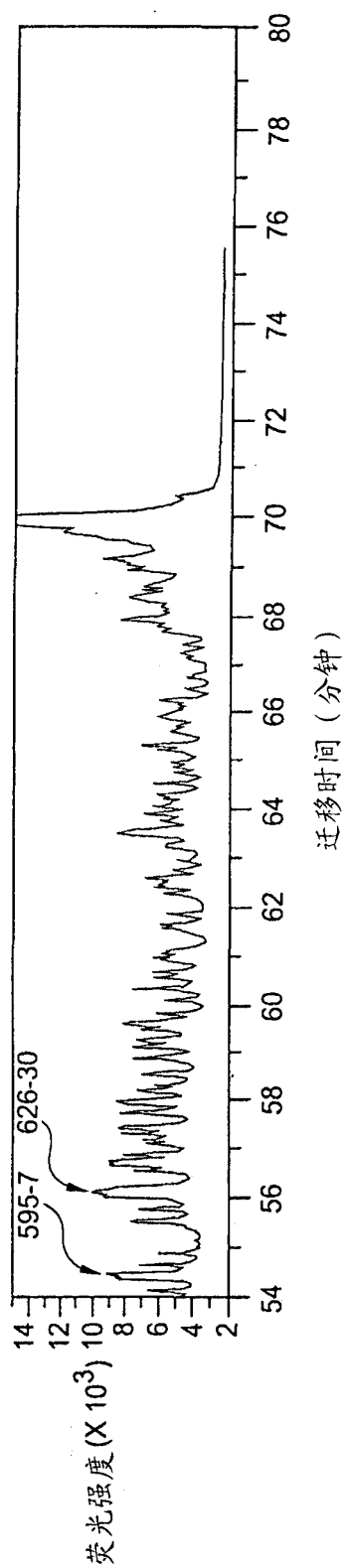


图 16A

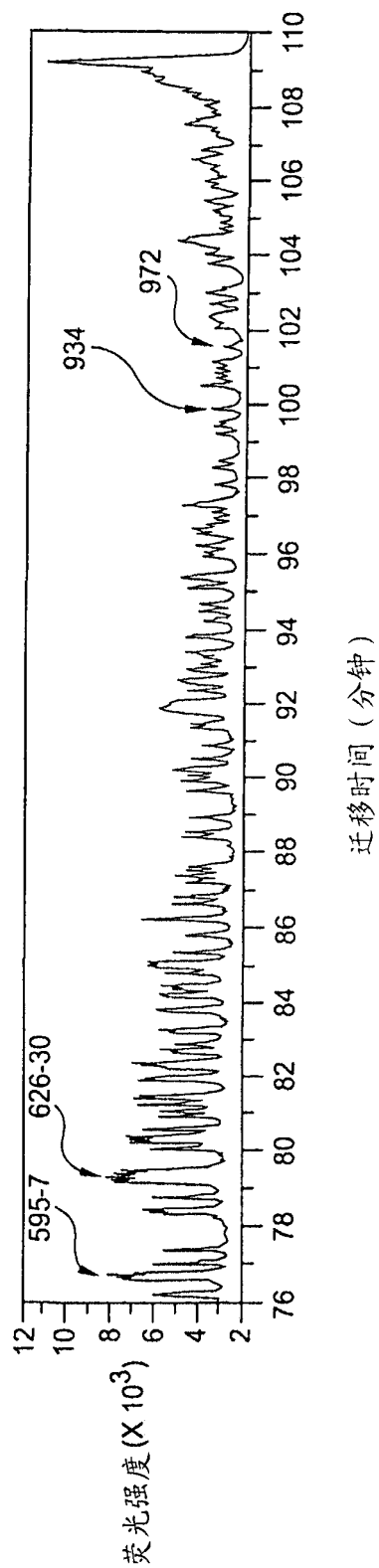


图 16B

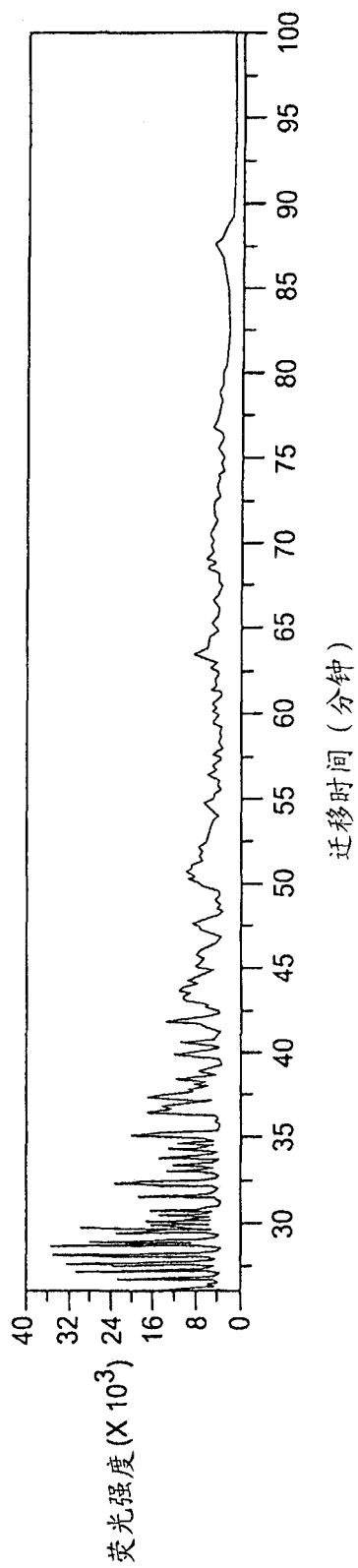


图 17A

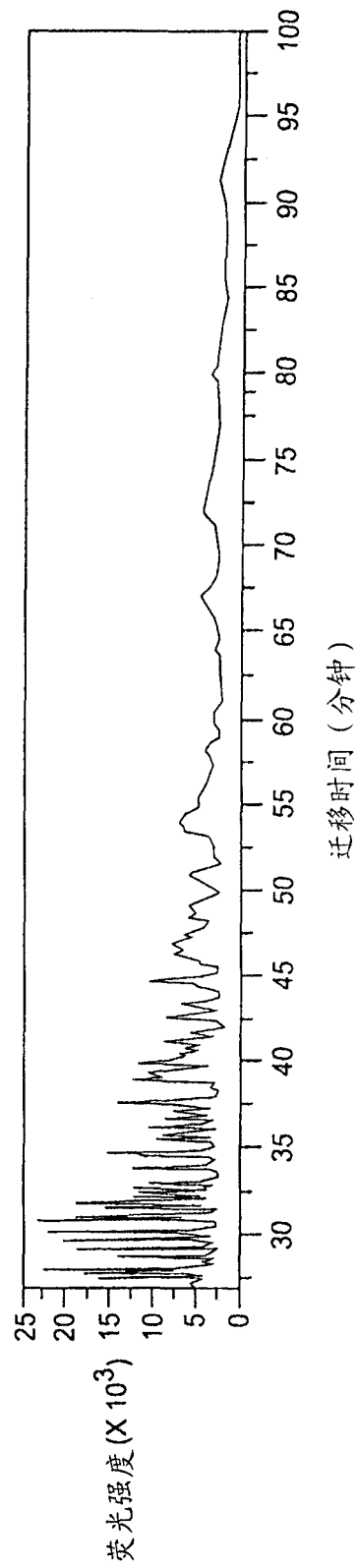


图 17B

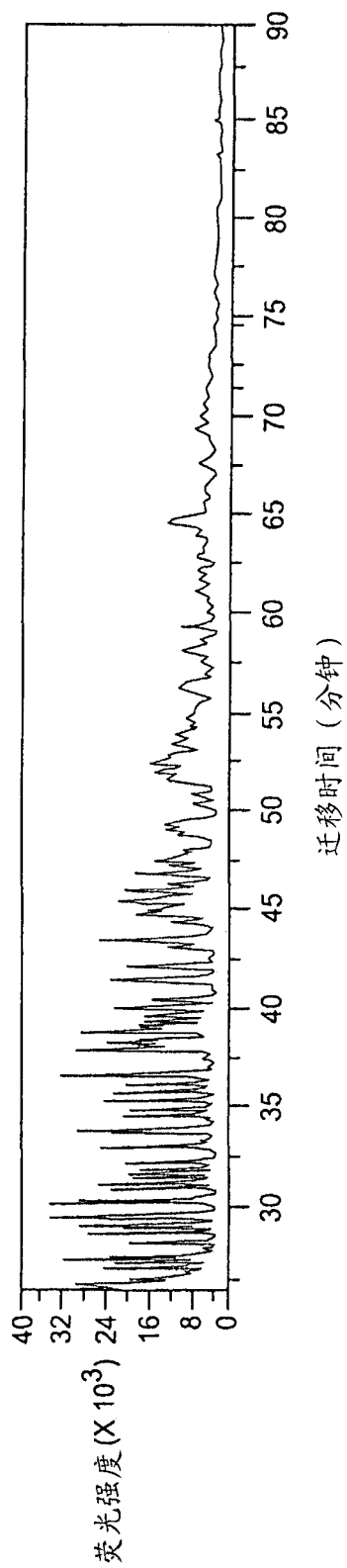


图 17C

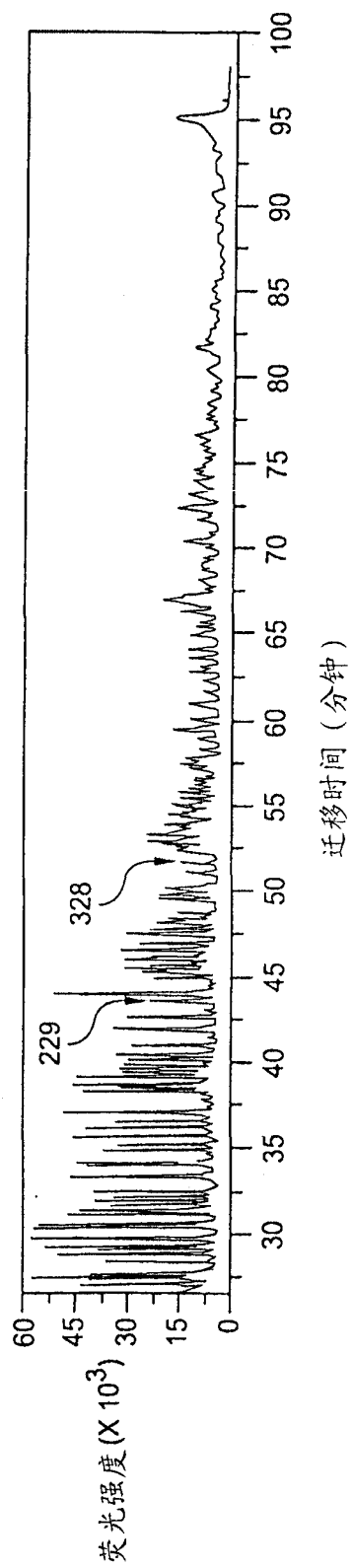


图 17D

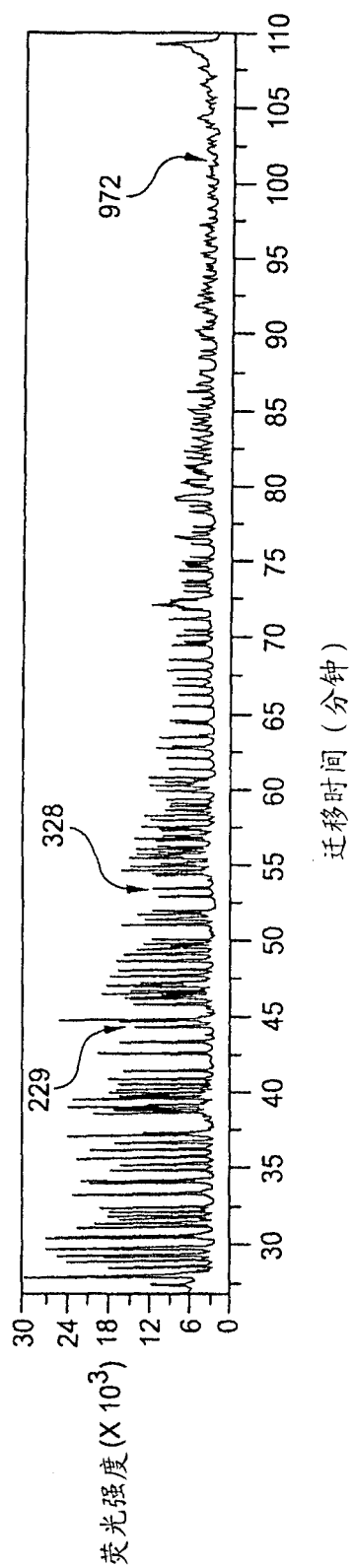


图 17E

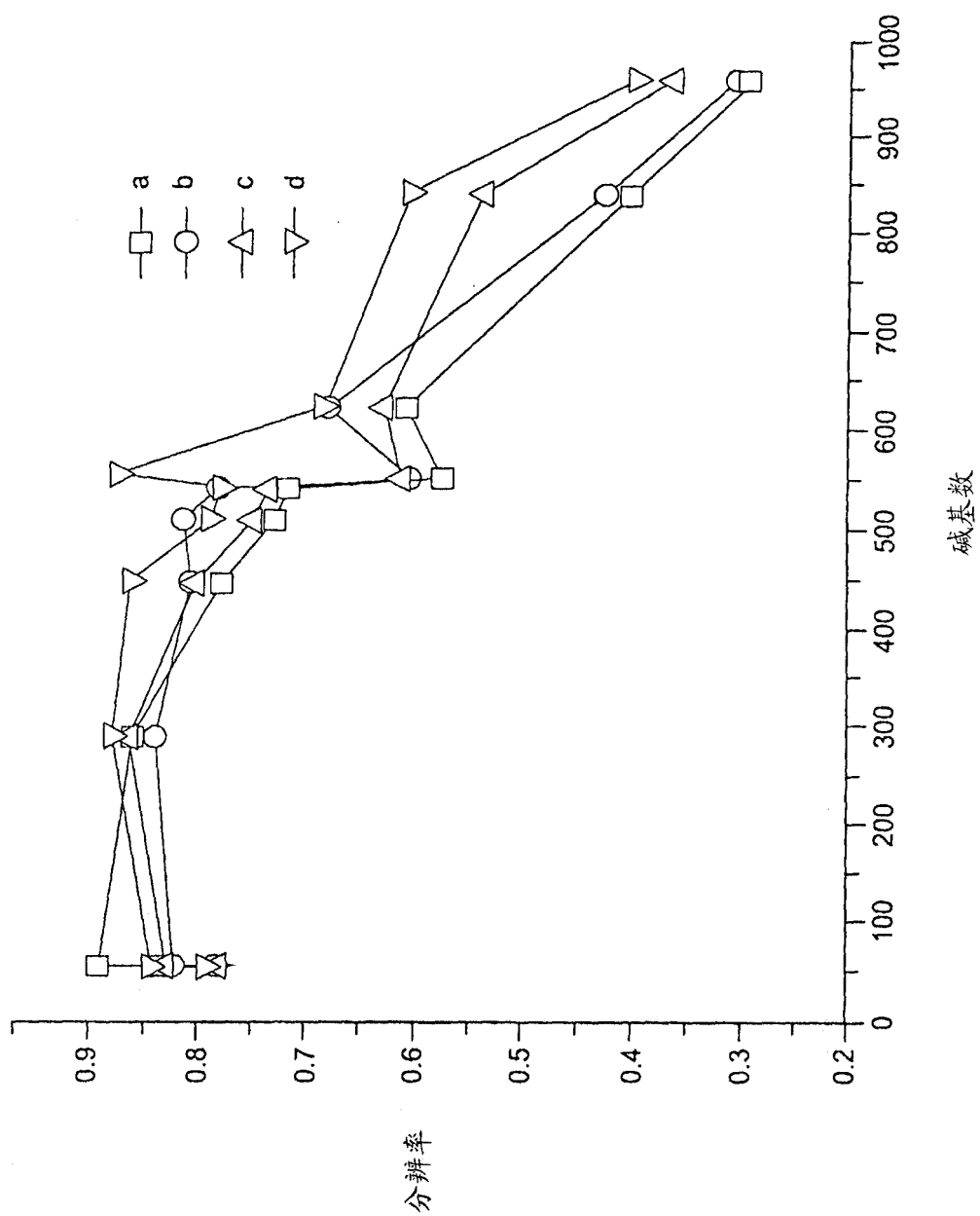


图 18

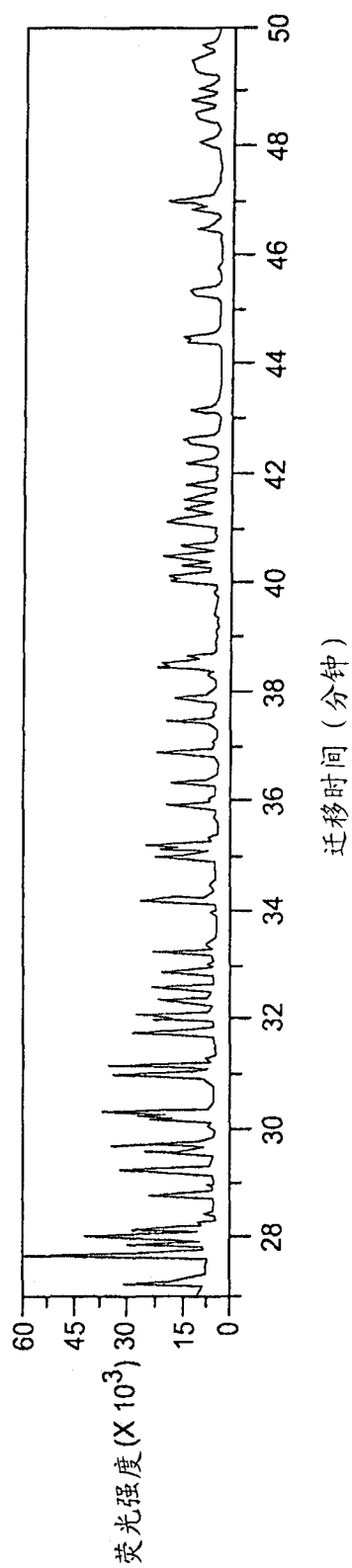


图 19A

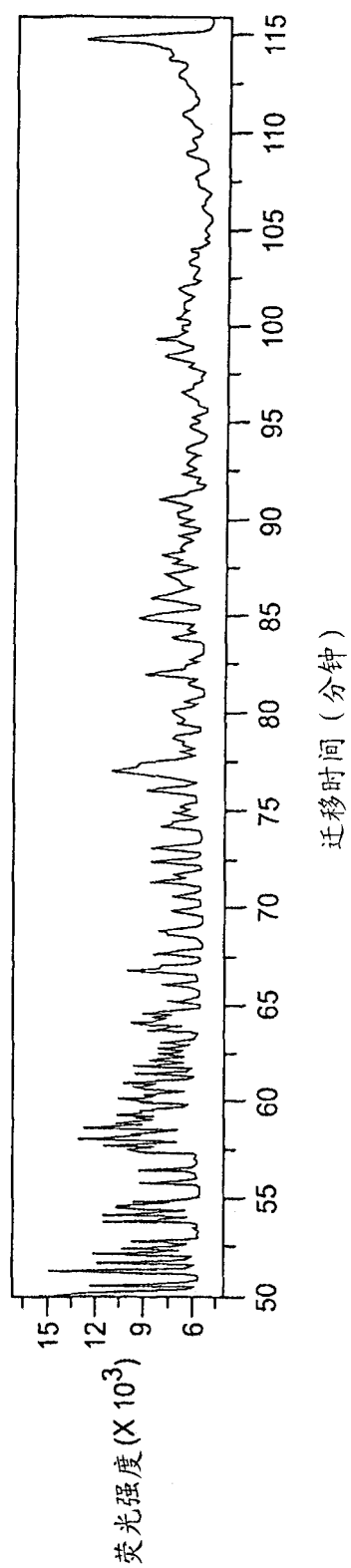


图 19B

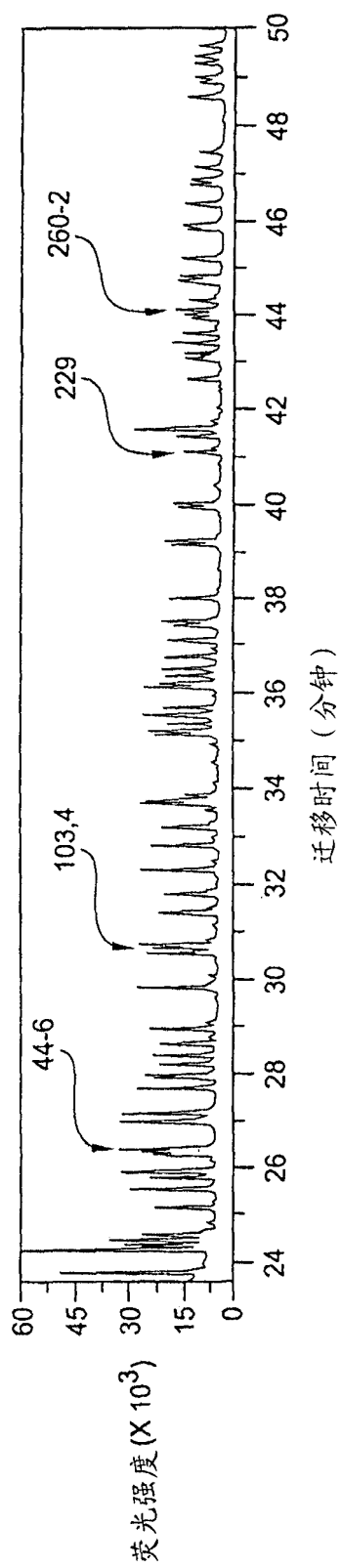


图 19C

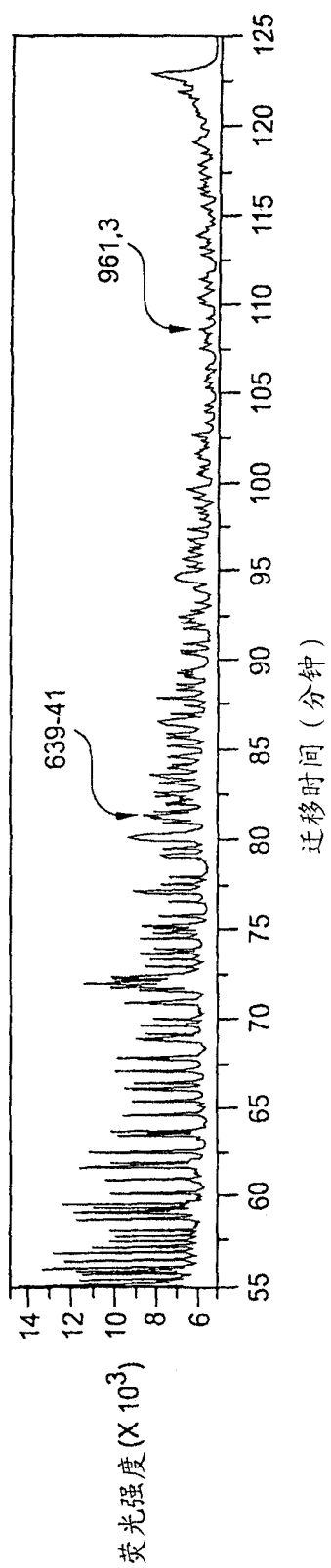


图 19D

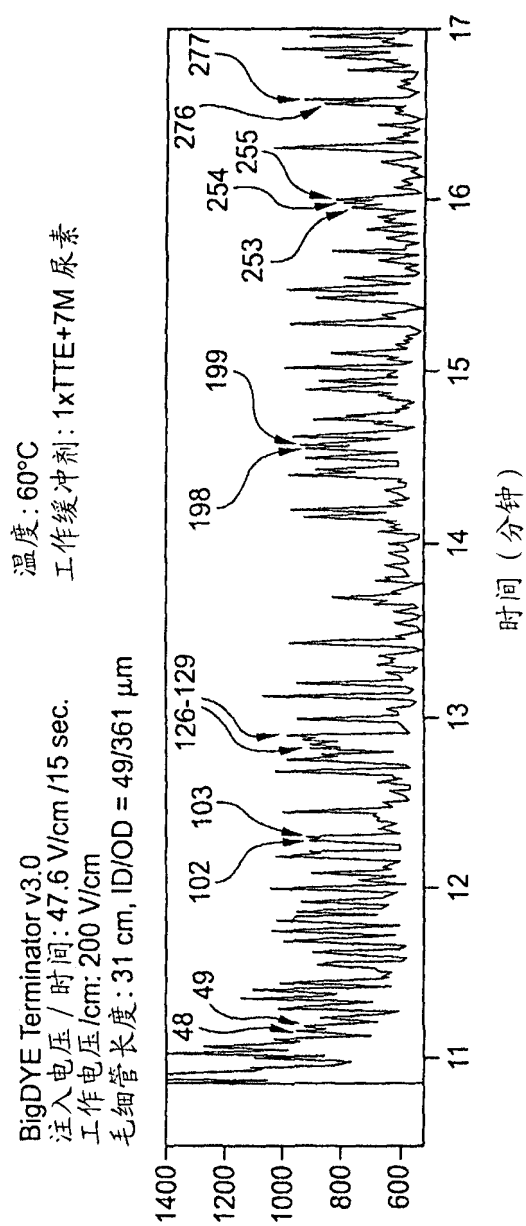


图 20A

BigDYE Terminator v3.0
 注入电压 / 时间: 47.6 V/cm / 15 sec.
 工作电压/cm: 200 V/cm
 毛细管长度: 31 cm, ID/OD = 49/361 μ m
 温度: 60°C
 工作缓冲剂: 1xTTE+7M 尿素

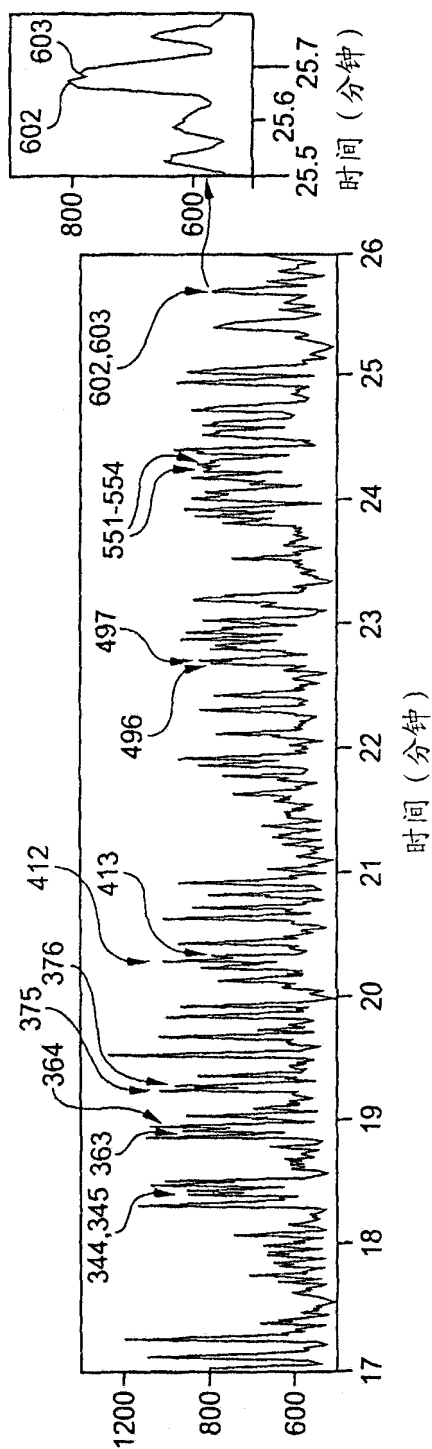


图 20B

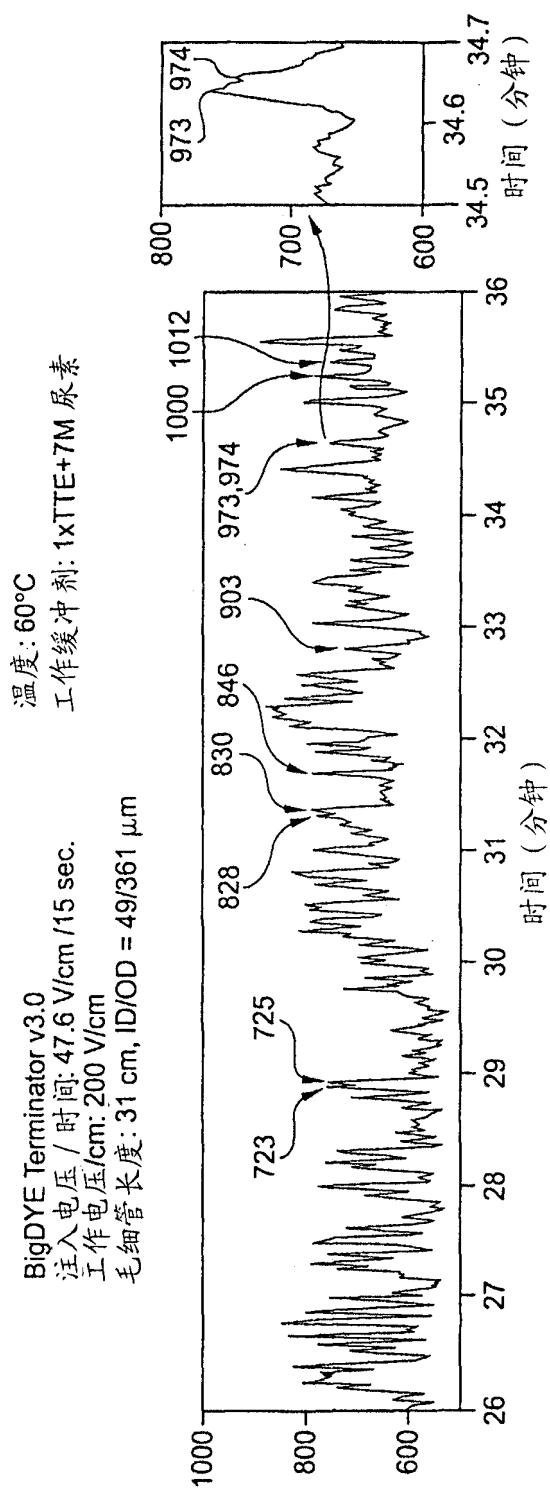


图 20C

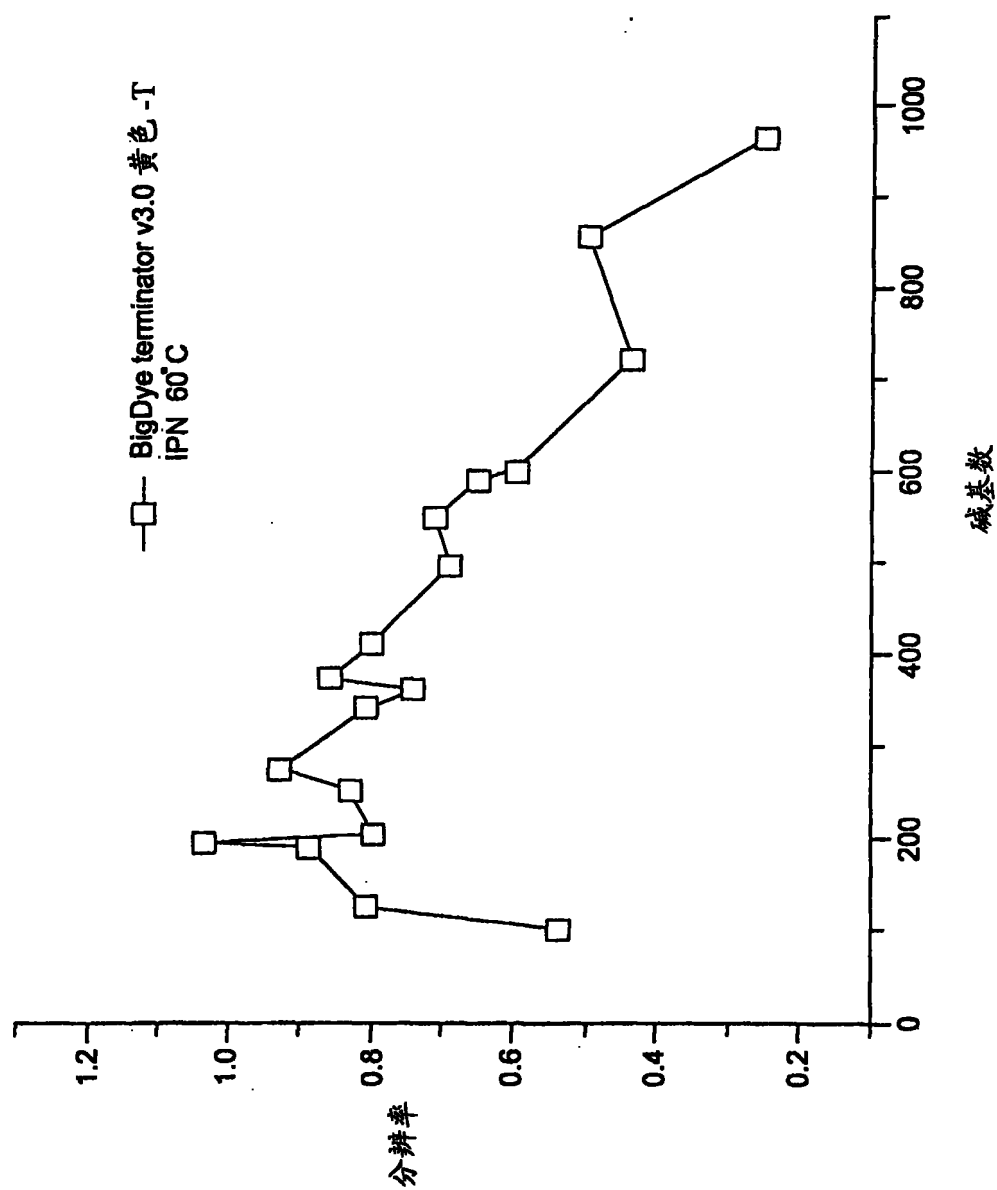


图 21