[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷
G01N 27/447

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01816229.0

[43] 公开日 2004 年 6 月 9 日　　[11] 公开号 CN 1503906A

[22] 申请日 2001.9.25　[21] 申请号 01816229.0

[30] 优先权

[32] 2000. 9.25 [33] US [31] 09/668,960

[86] 国际申请 PCT/US2001/042271 2001.9.25

[87] 国际公布 WO02/024313 英 2002.3.28

[85] 进入国家阶段日期 2003.3.25

[71] 申请人 埃普勒拉股份有限公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 卡尔·O·文斯

奥尔德里奇·N·K·劳

[74] 专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司

代理人 丁香兰

权利要求书 6 页 说明书 16 页 附图 4 页

[54] 发明名称 用于毛细管电泳的高速高分辨率组合物、方法和试剂盒

[57] 摘要

本发明提供用于高速高分辨率地分离分析物的组合物、方法和试剂盒，所述分离通过毛细管电泳采用未涂敷的毛细管进行。 所述组合物含有：包括非交联的丙烯酰胺聚合物的筛分组分和包括至少一种不带电荷和非交联水溶性二氧化硅吸收聚合物的表面相互作用组分。 本发明还提供在毛细管电泳中采用新颖组合物的方法，以及提供包括用于新颖方法的新颖组合物的试剂盒。

ISSN 1008-4274

知识产权出版社出版

1. 一种由毛细管电泳分离分析物的组合物，该组合物含有：

包括分子量为 1,000,000 至 3,000,000 道尔顿的非交联的丙烯酰胺聚合物的筛分组分；和

包括一种或多种选自 N,N-二取代聚丙烯酰胺和 N-取代聚丙烯酰胺的非交联的聚合物的表面相互作用组分，其中所述 N-取代基选自 C_1-C_3 烷基、卤素取代的 C_1-C_3 烷基、甲氧基取代的 C_1-C_3 烷基、和羟基取代的 C_1-C_3 烷基；其中筛分组分和表面相互作用组分相同或不同；

其中组合物并不包含交联的聚合物凝胶。

2. 根据权利要求 1 的组合物，其中所述组合物在 25℃下的粘度为小于 10,000 厘泊。

3. 根据权利要求 1 的组合物，其中所述组合物在 25℃下的粘度为小于 5000 厘泊。

4. 根据权利要求 1 的组合物，其中所述组合物在 25℃下的粘度为小于 1000 厘泊。

5. 根据权利要求 1 的组合物，其中所述组合物在 25℃下的粘度为小于 600 厘泊。

6. 根据权利要求 1 的组合物，其中一种或多种非交联的聚合物包括聚(N,N-二甲基丙烯酰胺)。

7. 根据权利要求 1 的组合物，该组合物还含有至少一种变性剂。

8. 根据权利要求 7 的组合物，其中所述至少一种变性剂是选自甲酰胺、脲和 2-吡咯烷酮的至少一种。

9. 根据权利要求 8 的组合物，其中所述至少一种变性剂包括脲。

10. 一种由毛细管电泳分离分析物的组合物，该组合物含有：

包括分子量为 1,000,000 至 3,000,000 道尔顿和在 25℃下的粘度为小于 10,000 厘泊的非交联的丙烯酰胺聚合物的筛分组分；

包括聚(N,N-二甲基丙烯酰胺)的表面相互作用组分；和

包括脲的变性剂；

其中组合物并不包含交联的聚合物凝胶。

11. 根据权利要求 10 的组合物，其中所述组合物在 25℃下的粘度为小于 5000 厘泊。

12. 根据权利要求 10 的组合物，其中所述组合物在 25℃下的粘度为小于 1000 厘泊。

13. 根据权利要求 10 的组合物，其中所述组合物在 25℃下的粘度为小于 600 厘泊。

14. 一种毛细管电泳元件，该元件包括：

未涂敷的毛细管；

在未涂敷的毛细管中用于分离分析物的组合物，该组合物含有：包括分子量为 1,000,000 至 3,000,000 道尔顿和在 25℃下的粘度为小于 10,000 厘泊的非交联的丙烯酰胺聚合物的筛分组分；和表面相互作用组分，该表面相互作用组分包括一种或多种非交联的聚合物的溶液；和

其中毛细管电泳元件并不包括交联的聚合物凝胶。

15. 根据权利要求 14 的毛细管电泳元件，其中所述组合物在 25℃下的粘度为小于 5000 厘泊。

16. 根据权利要求 14 的毛细管电泳元件，其中所述组合物在 25℃下的粘度为小于 1000 厘泊。

17. 根据权利要求 14 的毛细管电泳元件，其中所述组合物在 25℃下的粘度为小于 600 厘泊。

18. 根据权利要求 14 的毛细管电泳元件，其中一种或多种表面相互作用组分非交联的聚合物选自 N,N-二取代聚丙烯酰胺和 N-取代聚丙烯酰胺，其中所述 N-取代基选自 C_1-C_3烷基、卤素取代的 C_1-C_3烷基、甲氧基取代的 C_1-C_3烷基、和羟基取代的 C_1-C_3烷基。

19. 根据权利要求 18 的毛细管电泳元件，其中所述表面相互作用组分非交联的聚合物是聚(N,N-二甲基丙烯酰胺)。

20. 根据权利要求 14 的毛细管电泳元件，其中所述组合物还含有至少一种变性剂。

21. 根据权利要求 20 的毛细管电泳元件，其中所述至少一种变性剂

为选自甲酰胺、脲和2-吡咯烷酮的至少一种。

22. 根据权利要求21的毛细管电泳元件，其中所述至少一种变性剂包括脲。

23. 根据权利要求14的毛细管电泳元件，其中所述未涂敷的毛细管包括二氧化硅、煅烧的二氧化硅、石英、硅酸盐基玻璃、磷酸盐玻璃或含氧化铝的玻璃。

24. 根据权利要求14的毛细管电泳元件，其中所述未涂敷的毛细管包括塑料基材。

25. 根据权利要求14的毛细管电泳元件，其中所述组合物含有：包括分子量为1,000,000至3,000,000道尔顿和在25℃下的粘度为小于600厘泊的线性丙烯酰胺聚合物的筛分组分；包括聚(N,N-二甲基丙烯酰胺)的表面相互作用组分；和包括脲的变性剂；其中所述组合物并不包含交联的聚合物凝胶。

26. 根据权利要求25的毛细管电泳元件，其中所述未涂敷的毛细管包括二氧化硅、煅烧的二氧化硅、石英、硅酸盐基玻璃如硼硅酸盐玻璃、磷酸盐玻璃或含氧化铝的玻璃。

27. 根据权利要求25的毛细管电泳元件，其中所述未涂敷的毛细管包括塑料基材。

28. 一种由毛细管电泳分离分析物的方法，该方法包括：

在组合物中由毛细管电泳分离分析物，所述组合物含有：包括分子量为1,000,000至3,000,000道尔顿的非交联的丙烯酰胺聚合物的筛分组分；和包括一种或多种选自N,N-二取代聚丙烯酰胺和N-取代聚丙烯酰胺的非交联的聚合物的表面相互作用组分，其中所述N-取代基选自C_1-C_3烷基、卤素取代的C_1-C_3烷基、甲氧基取代的C_1-C_3烷基、和羟基取代的C_1-C_3烷基；其中筛分组分和表面相互作用组分相同或不同；其中所述组合物并不包含交联的聚合物凝胶。

29. 根据权利要求28的方法，该方法采用多个未涂敷的毛细管并联进行。

30. 根据权利要求28的方法，其中所述非交联的丙烯酰胺聚合物在

25℃下的粘度为小于1000厘泊。

31.根据权利要求28的方法，其中所述非交联的丙烯酰胺聚合物在25℃下的粘度为小于500厘泊。

32.根据权利要求28的方法，其中所述组合物还含有至少一种变性剂。

33.根据权利要求32的方法，其中所述至少一种变性剂是选自甲酰胺、脲和2-吡咯烷酮的至少一种。

34.根据权利要求33的方法，其中所述至少一种变性剂包括脲。

35.一种由毛细管电泳分离分析物的方法，该方法包括：

由毛细管电泳采用根据权利要求14的毛细管电泳元件分离分析物。

36.根据权利要求35的方法，该方法采用多个未涂敷的毛细管并联进行。

37.根据权利要求36的方法，其中未涂敷的毛细管包括二氧化硅、煅烧的二氧化硅、石英、硅酸盐基玻璃、磷酸盐玻璃或含氧化铝的玻璃。

38.根据权利要求36的方法，其中所述未涂敷的毛细管包括塑料基材。

39.一种由毛细管电泳分离分析物的方法，该方法包括：

由毛细管电泳采用根据权利要求25的毛细管电泳元件分离分析物。

40.根据权利要求39的方法，该方法采用多个毛细管并联进行。

41.根据权利要求40的方法，其中所述未涂敷的毛细管包括二氧化硅、煅烧的二氧化硅、石英、硅酸盐基玻璃、磷酸盐玻璃或含氧化铝的玻璃。

42.权利要求40的方法，其中未涂敷的毛细管包括塑料基材。

43.一种由毛细管电泳分离分析物的方法，该方法包括：

向具有第一和第二端的未涂敷的毛细管中插入组合物，该组合物含有：包括分子量为约1,000,000至3,000,000道尔顿的非交联的丙烯酰胺聚合物的筛分组分；和包括一种或多种选自N,N-二取代聚丙烯酰胺和N-取代聚丙烯酰胺的非交联的聚合物的表面相互作用组分，其中所述N-取代基选自C_1-C_3烷基、卤素取代的C_1-C_3烷基、甲氧基取代的C_1-C_3烷基、

和羟基取代的 C_1-C_3 烷基；其中筛分组分和表面相互作用组分相同或不同；其中所述组合物并不包含交联的聚合物凝胶；

在毛细管中装载不同大小的分析物的样品；和

在毛细管的第一和第二端之间施加电场使得样品中的不同大小的分析物通过毛细管迁移，因此分离分析物。

44. 根据权利要求 43 的方法，其中所述组合物还含有至少一种变性剂。

45. 根据权利要求 44 的方法，其中所述至少一种变性剂包括脲。

46. 根据权利要求 43 的方法，其中所述表面相互作用组分非交联的聚合物是聚(N,N-二甲基丙烯酰胺)。

47. 根据权利要求 43 的方法，该方法采用多个未涂敷的毛细管并联进行。

48. 根据权利要求 47 的方法，其中所述未涂敷的毛细管包括二氧化硅、煅烧的二氧化硅、石英、硅酸盐基玻璃、磷酸盐玻璃或含氧化铝的玻璃。

49. 根据权利要求 47 的方法，其中所述未涂敷的毛细管包括塑料基材。

50. 一种用于由毛细管电泳分离分析物的试剂盒，该试剂盒包括组合物，该组合物含有：包括分子量为约 1,000,000 至 3,000,000 道尔顿和粘度小于 1000 厘泊的非交联的丙烯酰胺聚合物的筛分组分；和包括一种或多种选自 N,N-二取代聚丙烯酰胺和 N-取代聚丙烯酰胺的非交联的聚合物的表面相互作用组分，其中所述 N-取代基选自 C_1-C_3 烷基、卤素取代的 C_1-C_3 烷基、甲氧基取代的 C_1-C_3 烷基、和羟基取代的 C_1-C_3 烷基；其中筛分组分和表面相互作用组分相同或不同；其中所述组合物并不包含交联剂。

51. 一种用于由毛细管电泳分离分析物的试剂盒，该试剂盒包括组合物，该组合物含有：包括分子量为约 1,000,000 至 3,000,000 道尔顿和在 25℃下的粘度小于 1000 厘泊的非交联的丙烯酰胺聚合物的筛分组分；其中所述组合物并不包括交联的聚合物凝胶。

52. 根据权利要求 51 的试剂盒，该试剂盒还包括表面相互作用组分，

该表面相互作用组分包括一种或多种选自N,N-二取代聚丙烯酰胺和N-取代聚丙烯酰胺的非交联的聚合物，其中所述N-取代基选自C_1-C_3烷基、卤素取代的C_1-C_3烷基、甲氧基取代的C_1-C_3烷基、和羟基取代的C_1-C_3烷基。

53.根据权利要求 52 的试剂盒，其中所述表面相互作用组分是聚(N,N-二甲基丙烯酰胺)。

54.根据权利要求 53 的试剂盒，该试剂盒还包括至少一种变性剂，该变性剂是选自甲酰胺、脲和 2-吡咯烷酮的至少一种。

55.根据权利要求 54 的试剂盒，其中所述至少一种变性剂包括脲。

56.一种由毛细管电泳分离分析物的组合物，该组合物含有：包括分子量为约 1,000,000 至 3,000,000 道尔顿的非交联的丙烯酰胺聚合物的筛分组分；其中所述组合物并不包括交联的聚合物凝胶。

用于毛细管电泳的高速高分辨率组合物、方法和试剂盒

技术领域

本发明涉及用于由毛细管电泳分离分析物的组合物、毛细管电泳元件和方法。也提供用于由毛细管电泳分离分析物的试剂盒。

背景技术

由于如下几项技术优点，毛细管电泳已经广泛用作分析技术：(i)毛细管具有高表面积对体积比，它允许更有效的热耗散，该热耗散因此允许使用高电场用于更快速的分离；(ii)该技术要求最小的样品体积；(iii)可获得大多数分析物的优异分辨率；和(iv)该技术易于自动化，参见，如 Camilleri,编辑,毛细管电泳:理论和实践(CRC Press,Boca Raton,1993)；和 Grossman 等人,编辑,毛细管电泳(Academic Press,圣地亚哥,1992)。由于这些优点，因此，人们的极大兴趣在于应用毛细管电泳以分离生物分子，特别是核酸。核酸，特别是脱氧核糖核酸(DNA)的快速和精确分离的需要引起聚合酶链反应(PCR)产物的分析和 DNA 测序，参见，如 Williams,方法：酶学方法中的陪伴， 4：227-232 (1992)；Drossman 等人， Anal.Chem. ， 62:900-903(1990) ； Huang 等人，Anal.Chem.64:2149-2154(1992) ； 和 Swerdlow 等人， 核酸研究，18:1415-1419(1990)。

由于在游离溶液中，对于不同大小的多核苷酸，电荷对摩擦拖动比相同，因此多核苷酸的电泳分离典型地包括筛分介质。初始选择的筛分介质典型地是交联的凝胶，但在一些情况下稳定性和制造性的问题导致如下非凝胶液体聚合物筛分介质的检验：如线性聚丙烯酰胺、羟烷基纤维素、琼脂糖、和乙酸纤维素等，如 Bode,Anal.Biochem.,83:204-210(1977) ； Bode,Anal.Biochem.,83:364-371(1977) ； Bode,Anal.Biochem.,92:99-110(1979) ； Hjerten 等人 ,J.Liquid

Chromatography, 12:2471-2477(1989)；Grossman, U.S. 专利 5,126,021；Zhu 等人, U.S. 专利 5,089,111；Tietz 等人, 电泳, 13:614-616(1992)。

可使由毛细管电泳的分离复杂化的另一种因素是电内渗现象。此现象，有时称为电渗透或电渗流(EOF)，是在毛细管中由电场诱导的流体流动。此现象阻碍毛细管电泳对如下状态的应用：其中典型地追求高分辨率分离，如在 DNA 测序片段的分析中。当毛细管内壁包含固定电荷时，该现象可引起毛细管电泳。这样的电荷可引起反荷离子移动层的形成，该移动层的形成依次，在电场存在下移动以产生液体的总体流动。令人遗憾的是，EOF 的数量可依赖于多种因素的主体而变化，包括电荷分布的变化、分析物组分和/或分离介质的选择性吸附、分离介质的 pH 等。由于可变性可降低人们接近地解析间隔分析物谱带的能力，已经进行许多尝试以直接或间接控制这样的流动。这些尝试包括毛细管内壁的共价涂敷或改性以抑制带电基团，高粘度聚合物的使用，缓冲剂 pH 和/或浓度的调节，用于共价涂敷毛细管壁的凝胶分离介质的使用，和对向毛细管轴为径向的电场的施加。

目前，通常使用预涂敷的毛细管进行核酸片段的毛细管电泳。预涂敷的毛细管一般制造昂贵，具有有限的寿命，并有可经受再生性的问题。对于采用大规模毛细管电泳使用并联运行的多个毛细管，这些问题是特别重要的。

发明内容

本发明提供用于分离样品中分析物的组合物。例如，DNA 测序片段或其它多核苷酸片段的单碱基分辨。提供的所述组合物含有：包括至少一种低粘度、高分子量、非交联的丙烯酰胺聚合物的筛分组分；和非必要地，包括至少一种非交联的聚合物的表面相互作用组分。在优选的实施方案中，组合物并不包括交联的聚合物凝胶。

另一方面，本发明包括毛细管电泳元件。毛细管电泳元件包括向其中插入用于分离分析物的组合物的未涂敷毛细管。位于毛细管中的组合物含有筛分组分和表面相互作用组分。

在另一方面，提供一种方法，其中本发明的组合物用于由毛细管电泳分离分析物。在某些实施方案中，本发明的方法使用多个未涂敷的毛细管或包含在此公开的新颖组合物的毛细管电泳元件并联进行。

在另一方面，本发明提供含有低粘度、高分子量、非交联的丙烯酰胺聚合物筛分组分而没有与其使用的相互作用组分的组合物，和此外的预涂敷毛细管。预涂敷的毛细管，例如购自 BioRad Life Sciences(Biocap XL 毛细管, 目录 no. 148-3081)。毛细管也可以使用本领域公知的方法预涂敷。这样的程序，例如，描述于 Cobb 等人，Anal. Chem. 62:2478(1990)，和 Grossman，U. S. 专利 No. 5,347,527。

本发明也提供由毛细管电泳分离分析物的试剂盒。在某些实施方案中，试剂盒包括在此提供的一种组合物。也提供包括与一种或多种这些组合物或方法一起使用的未涂敷的毛细管的试剂盒。

附图说明

图 1 说明使用 50℃的运行温度和含有平均分子量大约为 744,000 道尔顿 (Da)(0.75M)； 1,376,000Da(1.4M)； 2,015,000Da(2.0M)； 2,517,000Da(2.5M)；或 6,377,000Da(6.4M)的非交联的丙烯酰胺聚合物筛分组分的组合物，由标记的多核苷酸分子量梯度物的毛细管电泳收集的单碱基分辨率数据。图 1A(上部)显示单碱基分辨率对在核苷酸碱基中测量的片段大小的图。图示 1B 显示以分钟计的片段迁移时间对在核苷酸碱基中测量的片段大小的图。

图 2 说明使用图 1 所述的相同五种组合物，但在 60℃的运行温度下由标记的多核苷酸梯度物的毛细管电泳收集的单碱基分辨率数据。图 2A(上部)显示单碱基分辨率对在核苷酸碱基中测量的片段大小的图。图示 2B 显示以分钟计的片段迁移时间对在核苷酸碱基中测量的片段大小的图。

图 3 说明使用图 1 所述的相同五种组合物，但在 70℃的运行温度下由标记的多核苷酸梯度物的毛细管电泳收集的单碱基分辨率数据。图 3A(上部)显示单碱基分辨率对在核苷酸碱基中测量的片段大小的图。图

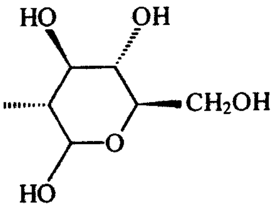
示3B显示以分钟计的片段迁移时间对在核苷酸碱基中测量的片段大小的图。

图4说明使用含有在图1中所述五种筛分组分的组合物，在50℃，60℃或70℃的运行温度下观察到的单碱基分辨率极限。此单碱基分辨率极限由图1，2和3中所示的单碱基分辨率数据的目测观察而预测。

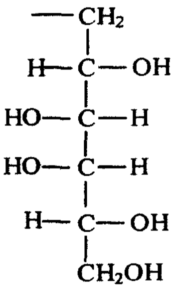
具体实施方式

定义

"丙烯酰胺"和"丙烯酰胺单体"表示具有通式 $H_2C=CR-C(=O)NR_1R_2$ 的结构，其中R可以是-H或$-CH_3$，R_1和R_2可以独立地是-H、$-CH_3$、$-(CH_2)_xOH$、$-CH_2CH(OH)(CH_2)_yOR_3$、$-CH(CH_2OH)CH(OH)CH_3$、$-CH_2CH_2(O\ CH_2CH_2)_p-OR_3$、$-CH_2CONH_2$、



或



，

R_3可以独立地是-H、$-CH_3$或$-CH_2CH_3$。x和y的数值为1-3和p的数值为1-200。

"平均分子量"表示由具有分子量多重性的聚合物种组成的样品种群的重均分子量(M_w)。此数量由如下公式定义：

$$Mw = \left(\sum_{i=1} n_i \times (M_i)^2\right) / \sum_{i=1} n_i \times M_i$$

其中n_i表示物种i分子的数目和M_i是第i物种的分子量。除非另外说明，在此使用的术语"分子量"表示重均分子量。

在此使用的术语"毛细管"表示用于进行电泳，即能够支撑分离介质的体积，如在此公开的分离分析物的组合物的体积，管子或沟槽或其它结构。毛细管的几何尺寸可以较宽地变化并包括，但不限于，具有圆形、矩形或正方形横截面的管子、沟槽、凹槽、板等，和可以由宽范围的技术制造。用于与本发明某些实施方案一起使用的毛细管的重要特征是与

分离介质体积接触的表面的表面积对体积比。此比例的高数值典型地允许在电泳期间从分离介质的更好传热。优选，在某些实施方案中，采用约 0.8-0.02μm⁻¹的数值。这些数值相应于内径为约 5μm-约 200μm 的圆形横截面的管状毛细管的表面积对体积比。术语“未涂敷的毛细管”表示毛细管在引入本发明组合物之前是未涂敷的，即在使用之前未共价涂敷。在某些实施方案中，用于本发明的毛细管由如下物质组成：二氧化硅、煅烧的二氧化硅、石英、硅酸盐基玻璃如硼硅酸盐玻璃、磷酸盐玻璃、含氧化铝的玻璃等或其它二氧化硅类似材料。在某些实施方案中，使用由塑料基材形成的毛细管。塑料基材可包括，例如，聚丙烯酸酯和聚烯烃，如 LUCRYL®(BASF，德国)、TPX™(Matsui Plastics，Inc.，White Plains，NY)、TOPAS®(Hoechst Celanese Corp.，Summit，NJ)、和 ZEONOR®(Zeon Chemicals，Louisville，KY)。其中，沟槽毛细管塑料基材的描述可以在 U.S. 专利 No. 5,750,015 中找到。

在此使用的术语“分离分析物的组合物”含有低粘度、高分子量筛分组分和非必要地，表面相互作用组分。这样的组合物特别用于使用毛细管电泳在游离溶液中分离多核苷酸，或具有不同大小但具有相似或相同电荷-摩擦拖动比的其它生物分子。熟练的技术人员会理解电荷携带组分，或电解质典型地包括在这样的组合物中。电荷携带组分通常是在恒定 pH 下保持分离介质的缓冲剂体系的一部分。分离分析物的组合物包含一种或多种非交联的丙烯酰胺聚合物。

术语“DNA 测序片段”表示产生用于获得关于选择的 DNA 目标序列的序列信息的 DNA 多核苷酸。这样的片段可以由酶方式产生，如由 Sanger 二脱氧方法，或化学方式，如由 Maxam 和 Gilbert 方法。片段可源自单测序反应(如在二脱氧胞啶三磷酸酯存在下进行的二脱氧测序反应)，或来自多于一种测序反应(如来自四种不同的二脱氧测序反应，它包括合适标记的 5’-引物以识别每个片段的 3’-末端碱基)。

“聚合物”以它的传统意义使用，表示由共价键结合在一起以形成链的更小单体或低聚物子单元组成的大分子。“均聚物”是仅由一种单体重复单元组成的聚合物。“共聚物”表示由两种或多种单体重复单元组成的

聚合物。线性聚合物由以一个连续长度键合在一起以形成聚合物分子的单体重复单元组成。支化聚合物类似于线性聚合物，但含有从沿主聚合物的各种支化点伸出的侧链。星型聚合物类似于支化聚合物，区别在于多个铡链从单一支化位置放射，导致星型或车轮和轮辐外观。

交联的聚合物包含，例如，在不是在它们末端的各点彼此共键结合的聚合物分子。交联可以在聚合工艺期间在交联剂存在下进行。在一些交联程度下，已知为凝胶点，凝胶化发生。在凝胶点，可见凝胶或不溶性聚合物形成，并且体系倾向于损失流动性。此交联的聚合物凝胶，它相应于交联以形成宏观分子的聚合物分子网络的形成，甚至在高温下不溶于所有的溶剂。丙烯酰胺聚合物和聚合物凝胶的讨论可以在本领域已知的参考文献中找到，例如 Odian,聚合原理,第三版(Wiley Interscience,1991)。

在此使用的术语“非交联的丙烯酰胺聚合物”表示包括丙烯酰胺单体，含有或没有支化的聚合物分子，但排除交联在一起的聚合物分子。因此，非交联的聚合物并不包含在不是它们末端各点键合的聚合物分子，并且在聚合期间并不进行凝胶化。

在此使用的术语“多核苷酸”表示天然或改性的核苷单体，包括双和单股脱氧核糖核苷、核糖核苷、其α-异头物形式等的线性聚合物。典型地，核苷单体由磷酸二酯键或其类似物键合以形成多核苷酸，然而，也设想肽核酸单体。在某些实施方案中，多核苷酸的大小为几个单体单元，如 20，到几千个单体单元。除非另外说明，每当多核苷酸由字母顺序，如“ATGCCTG”表示时，应理解核苷是从左到右为 5’⇒3’顺序和“A”表示脱氧腺苷酸，“C”表示脱氧胞苷，“G”表示脱氧鸟苷，和“T”表示脱氧胸苷。磷酸二酯键的类似物包括磷酸硫醇酯、磷酸二硫醇酯、磷酸硒酯、磷酸二硒酯、苯胺磷酸硫醇酯（Phosphoroanilothioate）、苯胺磷酸酯（Phosphoranilidate)、氨基磷酸酯等。

术语“单碱基分辨率”($R_{单碱基}$)表示来自大小差别为一个核苷酸的两个多核苷酸片段的两个峰之间的分辨率测量。单碱基分辨率可以使用如下公式数学确定：

$$R_{单碱基} = 2 \times \frac{t_n - t_{n+1}}{W_n = W_{n+1}}$$

其中 t_n是长度为 n 个核苷酸的多核苷酸片段的迁移时间；t_{n+1}是长度为 n+1 个核苷酸的多核苷酸片段的迁移时间；W_n是在来自长度为 n 个核苷酸的多核苷酸片段的峰的碱基处的全宽度；和 W_{n+1}是在来自长度为 n+1 个核苷酸的多核苷酸片段的峰的碱基处的全宽度。“迁移时间”是核苷酸片段移动毛细管或微沟槽长度，即从注入点到检测器的时间。

术语“单碱基分辨率极限”表示多核苷酸片段的大小，其中单碱基分辨率数值在特定系统中下降小于 0.58。

示例性实施方案的详细描述

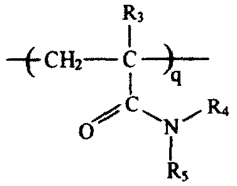
在此使用的分标题仅用于组织目的和不作为所述主题的限制。在此申请中引用的所有参考文献清楚地引入作为参考，用于到相同程度的任何目的好像每个参考文献特定和单独引入作为参考。

在某些实施方案中，本发明提供含有低粘度、高分子量、非交联的丙烯酰胺聚合物筛分组分的组合物。在其它实施方案中，组合物进一步含有表面相互作用组分，如聚二甲基丙烯酰胺(pDMA)。此外，本发明的组合物并不包括交联的聚合物凝胶。提供通过使用新颖组合物，用于分析物，特别是多核苷酸序列的高速、高分辨率毛细管电泳的方法。也提供用于采用这些方法的试剂盒。

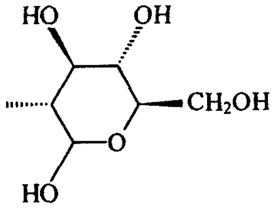
与已知电泳组合物相比，当用于公开的方法和电泳元件时，本发明组合物的一个益处在于分子量 1,000,000Da-3.000.000Da 的非交联丙烯酰胺聚合物提供不可预料的优点。分子量小于约 1,000,000Da 的线性丙烯酰胺聚合物比本发明的组合物提供更差的分辨率。分子量大于约 3.000.000Da 的线性丙烯酰胺聚合物呈现粘度问题和难以调节，如插入毛细管中和从毛细管中取出。因此，本发明的组合物在 25℃下的粘度小于 10,000 厘泊，优选小于 5,000 厘泊，和最优选小于 600 厘泊。非交联的丙烯酰胺聚合物可包括，例如，线性聚合物如聚丙烯酰胺(LPA)、支化聚合物，和星型聚合物。

筛分组分可包括不是聚丙烯酰胺的亲水性 N-取代丙烯酰胺聚合物

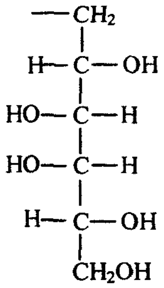
（即取代基连接到丙烯酰胺的氮上）。示例性亲水性 N-取代丙烯酰胺聚合物包括如下均聚物和它们的共聚物：



其中其中 R_3 可以是-H 或$-CH_3$，R_4 和 R_5 可以独立地是-H、$-CH_3$、$-(CH_2)_xOH$、$-CH_2CH(OH)(CH_2)_yOR_6$、$-CH(CH_2OH)CH(OH)CH_3$、$-CH_2CH_2(OCH_2CH_2)_p-OR_6$、$-CH_2CONH_2$、



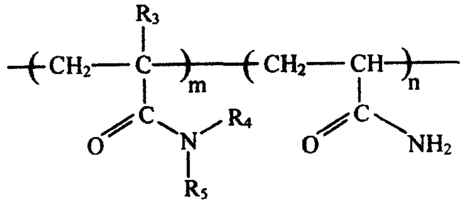
或



，

和 R_6 可以独立地是-H、$-CH_3$或$-CH_2CH_3$。x 和 y 的数值为 1-3 和 p 的数值为 1-200，和 q 与聚合物分子量直接成比例，其范围从几百到几十万。平均分子量为 100,000Da-25,000,000Da，优选 1,000,000Da-3,000,000Da。

适于用作公开的组合物中筛分组分的一种示例性亲水性 N-取代丙烯酰胺共聚合物是：



其中，R_3、R_4、R_5和共聚物的分子量，如先前所描述，和 m:n 的比例为约 100:1 至约 1:100。

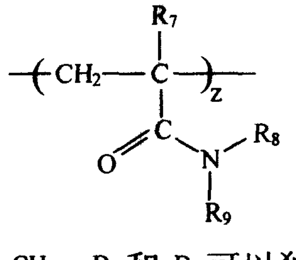
在某些实施方案中，筛分组分包括平均分子量为约 1,000,000Da-3,000,000Da 的非交联的丙烯酰胺聚合物。平均分子量为 1,000,000Da 或更大的非交联的丙烯酰胺聚合物提供改进的分辨率。平均分子量为 3,000,000Da 或更小的非交联的丙烯酰胺聚合物提供改进的流动性，使这样的聚合物更易于处理和装入未涂敷的毛细管。

在某些实施方案中，本发明组合物的表面相互作用组分包括一种或多种非交联的聚合物。这样的组分可属于各种化学品类别，如在如下参考文献中描述的那些：Molyneux,水溶性合成聚合物:性能和行为,卷I和II(CRC Press,Boca Raton,1982)；Davidson,编辑,水溶性树胶和树脂的手册(McGraw-Hill,纽约,1980)；Franks,编辑,水:广泛的专著(Plenum Press,纽约,1973)等。

可适于作为表面相互作用组分的示例性非交联聚合物包括聚乙烯基吡咯烷酮、N,N-二取代聚丙烯酰胺、N-单取代聚丙烯酰胺等。在某些实施方案中，表面相互作用组分包括 0.05-0.5%，优选 0.1-0.4%，和最优选 0.2%的聚(N,N-二甲基丙烯酰胺)(pDMA)。

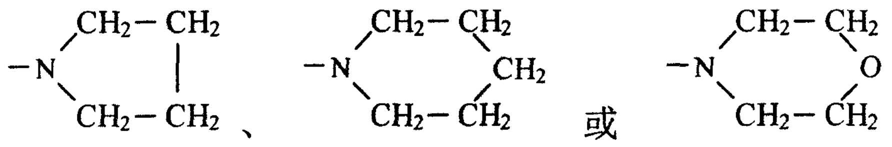
N-取代聚丙烯酰胺的示例性 N-取代基包括 C_1-C_{12}烷基、卤素取代的 C_1-C_{12}烷基、甲氧基取代的 C_1-C_{12}烷基、和羟基取代的 C_1-C_{12}烷基等。优选，卤素取代基是氟，羟基取代的 C_1-C_{12}烷基是单取代的。应理解典型地选择以上单体取代基使得获得的聚合物是水溶性的。例如，含 C_{12}烷基的单体通常仅以共聚物的小部分组分存在。更优选，示例性取代基选自 C_1-C_3烷基、卤素取代的 C_1-C_3烷基、甲氧基取代的 C_1-C_3烷基、和羟基取代的 C_1-C_3烷基。这样的聚合物由常规技术，如在如下文献中公开的技术合成：Odian,聚合原理,第三版(John Wiley,纽约,1991),Glass,编辑,水溶性聚合物:美丽和性能(Adv. Chem. Ser.,#213,American Chemical Society,华盛顿,1986)，和 Molyneux,水溶性聚合物:性能和行为,卷 I 和 II(CRC Press,Boca Raton,FL,1982)。

优选的表面相互作用组分是 pDMA。根据某些实施方案，不是 pDMA 的疏水性聚合物可以用作表面相互作用组分。它们包括，但不限于，如下均聚物：N-烷基-取代的丙烯酰胺和它们的共聚物，

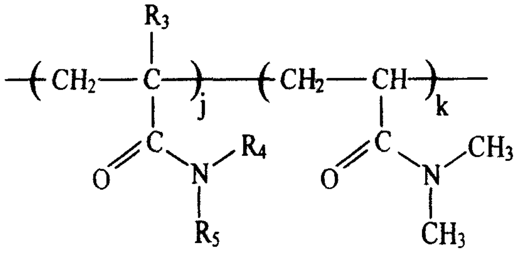


其中 R_7可以是-H 或-CH_3，R_8和 R_9可以独立地是-H、-CH_3、-CH_2CH_3、

$-CH_2CH_2CH_3$、$-CH(CH_3)_2$或$-CH_2CONH_2$，和 z 为约 2000-50,000。平均分子量为 200,000Da-5,000,000Da，优选 300,000Da-2,500,000Da。酰胺基团也可以是环状化合物如



可用作表面相互作用组分的共聚物的另一个例子包括如下结构：



其中，R_3、R_4、R_5和分子量如先前所描述，和 j:k 的比例为约 1:9 至约 9:1。

在某些实施方案中，含有分离介质的表面相互作用组分的聚合物可以在约 0.001%-约 10%重量:重量(w:w)的浓度下存在。优选，这样的聚合物在约 0.01%-约 1%w:w 的浓度下存在。

在某些实施方案中，组合物可包括另外的组分如变性剂。当需要防止双重或次级结构的形成时，这样的变性剂可以与，例如，包括多核苷酸的分析物一起使用。示例性变性剂包括甲酰胺，如 40-90%，脲，如 6-8M，市售内酰胺，如吡咯烷酮、2-吡咯烷酮（Pyrollidinone）等。在某些实施方案中，变性剂包括单独或结合的脲、甲酰胺，或 2-吡咯烷酮。在电泳中使用变性剂的指导可以在公知的分子生物学参考文献中找到，如 Sambrook 等人，分子克隆：实验室手册，第二版(Cold Spring Harbor Laboratory，纽约，1989)。

在某些实施方案中，组合物在 25℃下的粘度小于 10,000 厘泊(cp)。在其它实施方案中，组合物粘度在 25℃下小于 5,000cp，在 25℃下小于 1,000cp，或在 25℃下小于 600cp。使用 Brookfield Model DV-II 粘度计(Brookfield Engineering Laboratory, Inc.， Middleboro, MA)进行所有粘度测量。对于粘度小于 4000cp 的组合物，采用小样品适配器使用转轴 No.18。转轴速度对于粘度小于 1000cp 的样品是 3rpm，对于粘度为

1000-2000cp 的样品是 1.5rpm，和对于粘度为 2000-4000cp 的样品是 0.6rpm。对于粘度大于 4000cp 的样品，更小的转轴和不同的适配器是必须的。

用于进行毛细管电泳的设备是公知的。描述基本设备的许多参考文献可得到，并且几种毛细管电泳仪器可购得，如 Applied Biosystems(Foster City,CA)型号 270A、310、3100 或 3700 仪器。描述毛细管电泳设备和它们操作的示例性参考文献包括 Jorgenson,方法：酶学方法中的陪伴,4:179-190(1992)；Colburn 等人,Applied Biosystems Research News,1 期(1990 的冬季)；Grossman 等人(以上引用)等。

在某些实施方案中，采用缓冲剂体系以控制 pH 和作为携带电荷的组分。示例性缓冲剂包括：有机酸，如柠檬酸、乙酸或甲酸的水溶液；两性离子物，如 TES(N-三[羟甲基]-2-氨基乙磺酸)、BICINE(N，N-双[2-羟乙基]甘氨酸)、ACES(N-[2-乙酰氨基]-2-氨基乙磺酸)、TAPS(N-三[羟甲基]甲基-3-氨基丙磺酸)或双甘氨肽；无机酸，如磷酸；和有机碱，如 Tris(三[羟甲基]氨基甲烷)缓冲剂，如购自 Sigma 或 Calbiochem。缓冲剂浓度可以很多宽地变化，例如为约 1mM-1M。在某些实施方案中，用于本发明毛细管电泳方法的示例性缓冲剂溶液包括：(i)100mM TAPS，7M 脲，pH8.0；或(ii)TTE(50mM Tris-50mM TAPS)，7M 脲，pH8.0。

在某些实施方案中，双股多核苷酸，如 PCR 或 LCR 放大、酶消化物等的 DNA 片段由标准方案，或制造商建议的方案分离，其中采用商业毛细管电泳仪器，如型号 270HT、310、3100 或 3700 仪器(Applied Biosystems,Foster City)。对于这样标准或建议方案的例外在于采用本发明的组合物和/或毛细管电泳元件。在某些实施方案中，由毛细管电泳分离分析物的方法包括向含有第一和第二端的未涂敷毛细管中插入含有筛分组分和表面相互作用组分的组合物。在毛细管中装载不同尺寸分析物的样品和在毛细管的第一和第二端之间施加电场。样品中的不同尺寸分析物通过毛细管中的组合物迁移，分离分析物。在其它实施方案中，使用预涂敷的毛细管。在某些实施方案中，组合物包括一种在此公开的组合物。

本发明的某些方法可用于 DNA 测序。在某些实施方案中，这样的测序包括由 DNA 测序方案制备的单股多核苷酸的分离。DNA 测序方案的详细描述可以尤其在如下文献中找到：自动化的 DNA 测序化学指导(Applied Biosystems,部分 No.4305080)；Sambrook 等人,分子克隆::实验室手册,第二版(Cold Spring Harbor Laboratory,纽约,1989)；Ausbel 等人,在分子生物学中的目前方案(John Wiley & Sons,1993,包括通过 2000 年 8 月的补充)等。

某些目前可获得的 DNA 测序方案的重要特征是单股多核苷酸的“嵌套系列物”或“梯度物”或 DNA 测序片段的产生，它们可以根据大小分离。DNA 测序的链终止方法可包括(1)提供低聚核苷酸引物和包含要确定其序列的目标核酸的核酸模板，(2)将低聚核苷酸引物杂交到模板核酸上，(3)在包含核苷三磷酸酯前体和至少一种链终止核苷酸的反应混合物中，采用核酸聚合酶，如 T7DNA 聚合物酶、Sequenase™、反转录酶等扩展引物以形成 DNA 片段群的嵌套系列物，使得每个更短的 DNA 片段是每个更长 DNA 片段的子序列，并使得相同大小的每个 DNA 片段末端具有相同的链终止核苷酸，(4)根据大小分离 DNA 片段群，和(5)识别与每个 DNA 片段群相关的链终止核苷酸。然而，熟练的技术人员会理解 DNA 测序方法的许多变化是可得到的。

可接受的模板包括在本领域，如 ABI 型号 370A DNA 测序器的技术手册(Applied Biosystems,Foster,CA)中讨论的那些。例如，可以将目标序列插入合适的克隆载体，如 M13 克隆载体的复制形式中，然后将它繁殖以扩大目标序列的复制数。将 M13 的单股形式分离用作模板。同样，可以由在本领域，如以下文献中教导的聚合酶链反应(PCR)提供模板：Innis 等人,(以上引用)；Wilson 等人,Biotechniques,8 卷,184-189 页(1990)；Gyllensten,Biotechniques,7 卷,700-708 页(1989)等。在扩大之后，在某些实施方案中，模板可以在液相中用于聚合反应或连接到固相载体上，如由如下文献教导的那样：Stahl 等人，核酸研究,16 卷,3025-3038(1988)；Hultman 等人,核酸研究,17 卷,4937-4946(1989)等。

一旦产生嵌套系列物 DNA 片段，使用本发明的组合物，毛细管电泳元件，或方法由毛细管电泳分离它们。

以上已经描述了本发明，本发明可以通过参考实施例更好地理解。如下实施例仅用于说明的目的，而不应当以任何方式限制本发明的范围。

实施例

实施例 1

由溶液聚合非交联的丙烯酰胺聚合物的制备

在装配有用于机械搅拌的 2”Teflon 叶片，用于净化的渗出管，和温度计的 500mL 三颈圆底烧瓶中制备包含 94.50g 蒸馏水(18M ohm-cm)和 32.02g(0.129mol)的 28.57wt%丙烯酰胺溶液(Bio-Rad, Hercules, CA)的溶液。采用恒定机械搅拌，在 150mL/min 的流量下将超纯氦(99.99%)鼓泡入溶液中 120 分钟，以将溶液脱氧。向此脱氧的溶液中，采用注射器加入 1.0mL(13.06mmol)2-丙醇(异丙醇)和 4.0mL(0.35mmol)的 1.99wt%过硫酸铵(99.99%纯, Aldrich)溶液。采用在 150rpm 下的恒定机械搅拌和在 150ml/分钟下的氦净化，将烧瓶浸入在 50±1℃下的油浴中 120 分钟。将反应采用搅拌加入 200mL 蒸馏水而骤冷和采用空气鼓泡 10 分钟。将获得的水透明溶液放入再生的50K 分子量截止(MWCO)Spectra/Por-7 纤维素膜中，并对 4.5 加仑蒸馏(18M ohm-cm)水透析三天。每天换两次水。将透析溶液冻干，获得 8.41g 非交联的丙烯酰胺聚合物(92%收率)。

由凝胶渗透色谱(GPC)使用 American Polymer Standards (Mentor, Ohio)的聚丙烯酰胺主标准物表征此聚合物。在于 30℃采用串联的三个色谱柱，Ultrahydrogel (Waters Corp. Milford, MA) 2000 埃柱，Ultrahydrogel 1000 埃柱，和保护柱，使用 0.05M $NaNO_3$，在 1ml/min 的流量下进行分离。注射体积是 100μl 和检测器是 Knauer DRI 8X。发现此非交联的丙烯酰胺聚合物的 M_n 为 589 千道尔顿(kDa)，M_w 为 2517kDa(图 1-3 中的 2.5M)，和多分散性为 4.23。由间歇模式光散射测量的 M_w 是 1936kDa(表 1 中的制备编号 1)。熟练技术人员理解观察到的聚合物分子量可依赖于表征方法而变化。在所附权利要求中引用的分子量是基于上

述 GPC 方法。

在使用之前，将聚合物在 40℃下真空干燥至少 4 小时。

实施例 2

由溶液聚合另一种非交联的丙烯酰胺聚合物的制备

如在实施例 1 中制备第二种非交联的丙烯酰胺聚合物，区别在于将 2.0mL(26.12mmol)异丙醇加入到脱氧溶液中。熟练技术人员会理解异丙醇用作链转移剂，当制备聚合物时限制聚合物的分子量。因此，通过改变异丙醇的数量，可以改变聚合物的分子量。

如在实施例 1 中那样，将获得的水透明溶液透析和冻干。产量是 9.0g 非交联的丙烯酰胺聚合物(98%收率)。由凝胶渗透色谱表征聚合物并发现 M_n为 310kDa，M_w为 1376kDa(图 1-3 中的 1.4M)，和多分散性为 4.40。由间歇模式光散射测量的 M_w是 975kDa(表 1 中的制备编号 2)。

遵循在实施例 1 和 2 中描述的溶液聚合程序，通过改变异丙醇的数量(参见表 1，制备编号 1-4)制备具有不同分子量的另外的非交联丙烯酰胺聚合物。

表 1.非交联的丙烯酰胺聚合物制备。

制备编号	摩尔比[异丙醇]:[丙烯酰胺]	收率(%)	Mw(间歇模式光散射)	Mw(GPC 方法)
1	0.101	92.0	1936 kDa	2517 kDa (2.5 M)
2	0.203	98.0	975 kDa	1376 kDa (1.4 M)
3	0.112	98.0	1325 kDa	2015 kDa (2.0 M)
4	0.406	82.0	697 kDa	744 kDa (0.75 M)
5	N/A	-	12500 kDa	6377 kDa (6.4 M)

实施例 3

由反向乳液聚合非交联的丙烯酰胺聚合物的制备

第五种非交联的丙烯酰胺聚合物由反向乳液聚合(IEP)制备如下。向 1L 聚丙烯烧杯中加入 100.05g Petrolum Special(bp180-220℃,FLuka)，

100.01g 的 28.57wt%丙烯酰胺溶液(Bio-Rad)，2.50g 脱水山梨醇单油酸酯(Fluka)，和 1.00mL 过硫酸铵 1.0109wt%溶液(99.99%, Aldrich)。通过采用 2”磁力搅拌棒在 800rpm 下搅拌 10 分钟乳化混合物。然后将乳液转移入装配有用于机械搅拌的 2”Teflon 叶片用于净化的渗出管和温度计的 1L 三颈圆底烧瓶中。采用在 300rpm 下的恒定机械搅拌，将乳液采用超纯氦(99.99%)在 150mL/min 流量下净化 120 分钟。向乳液中使用微量注射器加入 0.010mL 的 N,N,N,N-四甲基乙二胺(超纯,Armesco)。采用在 300rpm 下的恒定机械搅拌和在 150mL/min 流量下氦气净化 19 小时，将烧瓶降入在 35±1℃下的油浴中。在聚合期间，乳液的温度从不超过 35℃。

在 19 小时之后，加入 400mL 丙酮和将乳液在 300rpm 下搅拌 2 小时。使聚合物粉末沉淀并将上清液层滗析。向沉淀的聚合物中，加入 300mL 丙酮，将机械搅拌器由 1.5”蛋形磁力搅拌棒代替，并在 800rpm 下搅拌 3 小时。沉淀的聚合物变成非常细的粉末。使此粉末沉降，并滗析有机层。将聚合物粉末采用 300mL 丙酮磨碎和在 800rpm 下再搅拌 3 小时。将聚合物吸滤，并采用很多量的丙酮清洗。将大约 5.4 克湿聚合物粉末加入到 450mL 蒸馏水和将溶液采用 1”磁力搅拌棒在 75rpm 下搅拌两天。将获得的混合物分入五个 50mL Falcon 管中和翻转两天以得到非常粘性的溶液。将此溶液放入再生的 50KMWCO Spectra/Por-7 纤维素膜中，并对 4.5 加仑蒸馏(18M ohm-cm)水透析三天。每天换两次水。将透析溶液冻干，获得 4.50g 非交联的丙烯酰胺聚合物。由间歇模式光散射测量的 M_w 是 12500kDa，和由凝胶渗透色谱测量的 M_w 是 6377kDa(表 1 中的制备编号 5；图 1-3 中的 6.4M)。

实施例 4

示例性筛分组分的制备

用于本发明组合物的示例性筛分组分制备如下。将一百毫克表 1 所示的任何非交联的丙烯酰胺聚合物加入到如下物质中：2.44 克水，0.075 克 12.3%pDMA 溶液，和 0.5 克 1M Na-TAPS/10mM EDTA 缓冲剂，pH8.0。通过在转子轮上旋转过夜溶解混合物。在此程序之后，制备五种不同的筛分组分，每种包括表 1 所示的不同的非交联的丙烯酰胺聚合物。

实施例 5

由毛细管电泳分离分析物

通过结合实施例 4 的五种筛分组分的一种与 0.2%pDMA 制备用于分离分析物的五种示例性组合物。使用含有 47cm 未涂敷毛细管(36cm 从注射端到检测器)的 ABI310 毛细管电泳设备(Applied Biosystems, Foster City, CA)，分析这五种组合物以评价它们分离多核苷酸分析物的能力。在每次分析之前，通过将五种组合物的一种泵入经过未涂敷的毛细管 400 秒而制备毛细管电泳元件。

在甲酰胺中溶解分析物，分析物包括荧光标记的 DNA 测序片段和单股 DNA 测序梯度物，梯度物包括 18 个已知大小的 DNA 片段，由荧光染料 TET 标记。在 1.5kV 下将此分析物溶液注入毛细管电泳元件中 10 秒。在 50℃，60℃或 70℃的运行温度下使用 200V/cm 的电场进行分离。

测量峰宽度(定义为高斯峰标准偏差的 4 倍)和峰从 DNA 测序梯度物和片段的迁移时间。这些数值用于计算单碱基分辨率数值。在每个运行温度下进行的三次或四次重复运行的单碱基分辨率数值和迁移时间见图 1，2 和 3。

五种组合物和三个运行温度的单碱基分辨率极限见图 4。不管运行温度，当聚合物分子量增加增加直到约 3,000,000Da 时，单碱基分辨率(见图 4)。然而，当聚合物分子量增加大于约 3,000,000Da 时，三个运行温度曲线的每一个达到稳定水平。因此，增加聚合物分子量大于约 3,000,000Da 并不显著增加单碱基分辨率。然而，增加聚合物分子量大于约 3,000,000Da 引起聚合物溶液粘度的快速增加。例如，用于实施例的 2,500,000Da 聚合物的粘度大约是 500 厘泊，而 6,400,000Da 聚合物的粘度大于 50,000 厘泊。因此，分子量为 1,000,000-3,000,000Da 的筛分组分提供有效的单碱基分辨率同时足够保持用于毛细管装载的低粘度。

尽管已经参考各种应用、方法和组合物描述了本发明，但应该理解可以进行各种变化和修改而不背离本发明。提供以上实施例以更好地说明本发明而不是用于限制本发明的范围。

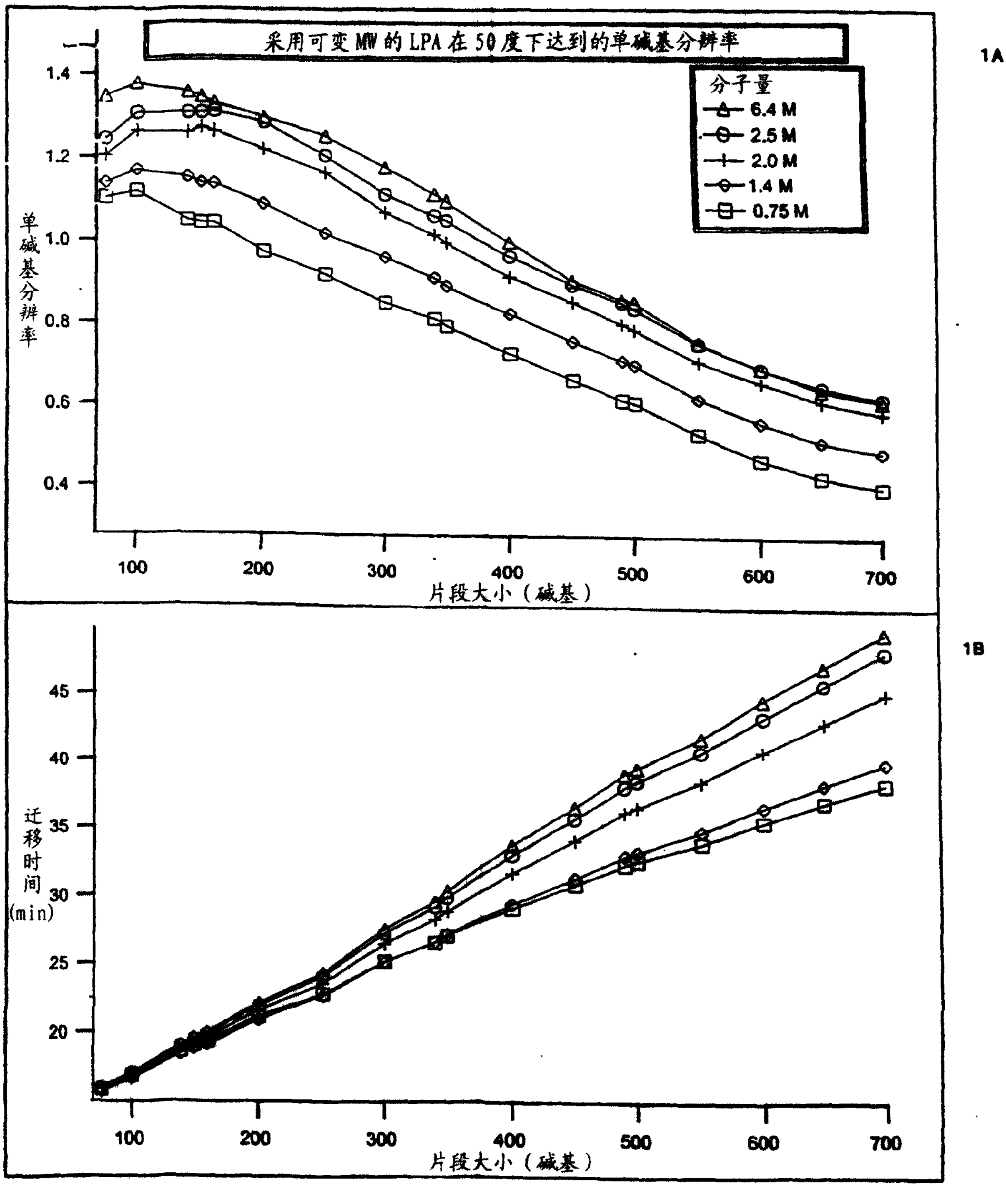

采用可变MW的LPA在50度下达到的单碱基分辨率
1A
分子量
6.4 M
2.5 M
2.0 M
1.4 M
0.75 M
单碱基分辨率
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
100
200
300
400
500
600
700
片段大小（碱基）
1B
迁移时间(min)
45
40
35
30
25
20
100
200
300
400
500
600
700
片段大小（碱基）

图 1

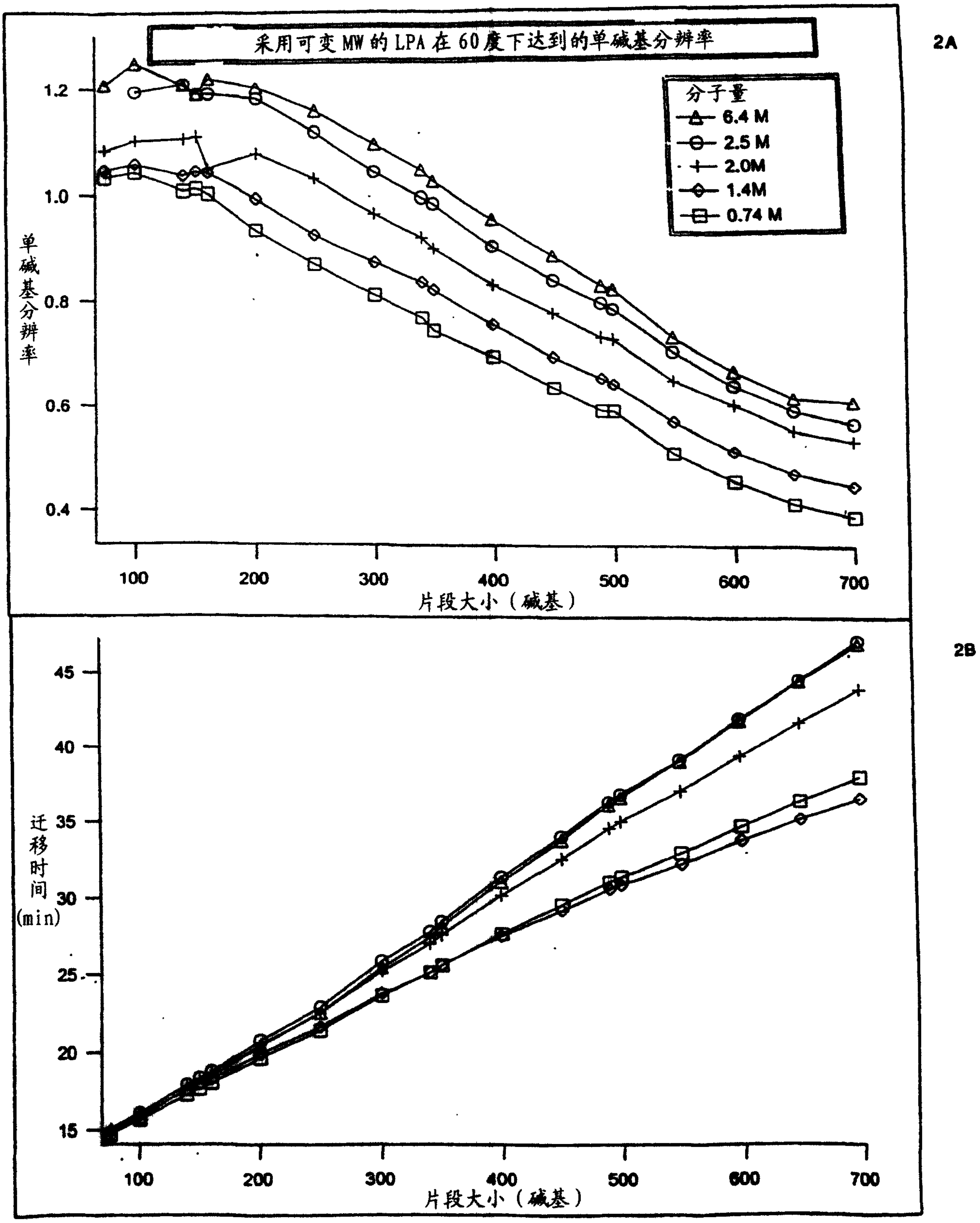
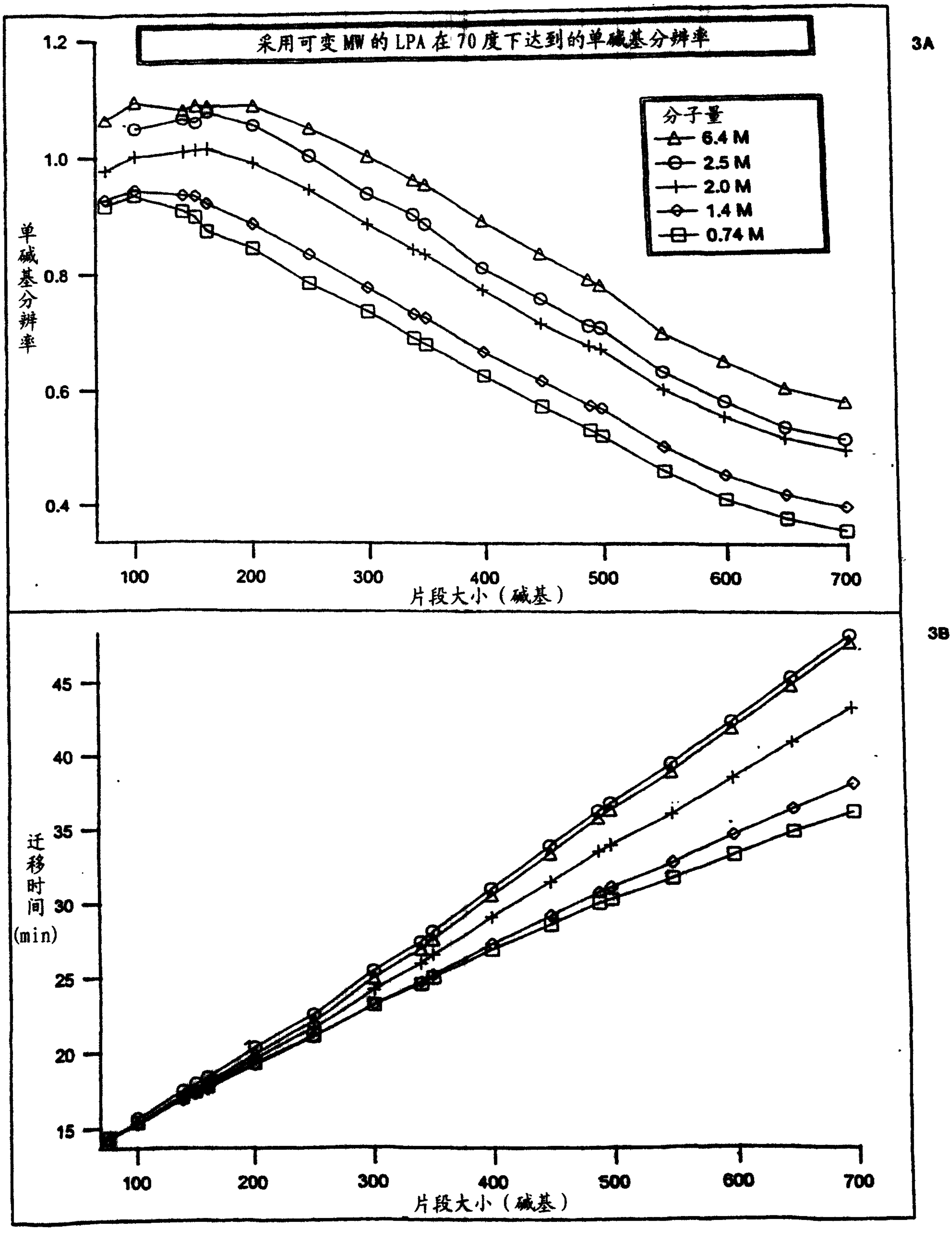

采用可变MW的LPA在60度下达到的单碱基分辨率
2A
分子量
6.4 M
2.5 M
2.0M
1.4M
0.74 M
单碱基分辨率
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
100
200
300
400
500
600
700
片段大小（碱基）
2B
45
40
35
30
25
20
15
迁移时间(min)
100
200
300
400
500
600
700
片段大小（碱基）

图 2



采用可变MW的LPA在70度下达到的单碱基分辨率
3A
分子量
6.4 M
2.5 M
2.0 M
1.4 M
0.74 M
单碱基分辨率
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
100
200
300
400
500
600
700
片段大小（碱基）
3B
迁移时间(min)
45
40
35
30
25
20
15
100
200
300
400
500
600
700
片段大小（碱基）

图3

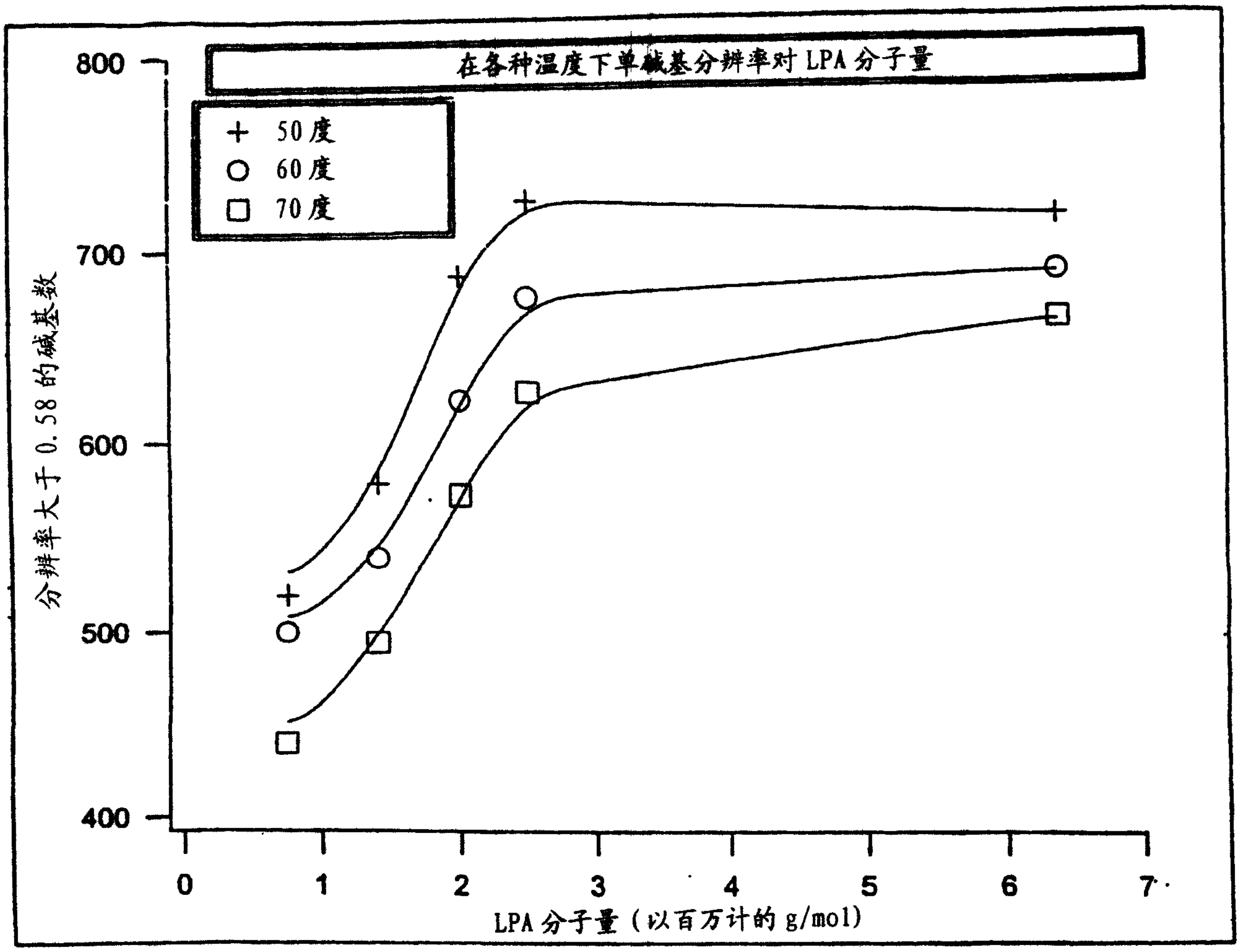

在各种温度下单碱基分辨率对 LPA 分子量
+ 50度
○ 60度
□ 70度
800
700
600
500
400
分辨率大于 0.58 的碱基数
0
1
2
3
4
5
6
7
LPA 分子量（以百万计的 g/mol）

图 4