

羟乙基纤维素中毛细管电泳 DNA 分离特性研究

刘晨晨^a 李振庆^{*,a} 孟凡明^a 倪一^a 窦晓鸣^a 山口佳则^{b,a}^(a) 教育部光学仪器与系统工程研究中心 上海市现代光学系统重点实验室 上海理工大学光电信息与计算机工程学院 上海 200093)^(b) 大阪大学先进光子学中心 大阪 565-0871)

摘要 本实验以羟乙基纤维素(HEC)为筛分介质,以 100~1500 bp DNA ladder 为分离对象,系统地研究了直流电场下毛细管电泳时 DNA 分离特性. 论文考察了 DNA 迁移淌度及分离度随 HEC 溶液浓度和分子量、毛细管两端电场强度(E)、毛细管有效长度(l_e)及其内径形状、背景电解液(BGE)温度等因素变化规律. 研究发现: (1)当筛分介质 HEC 浓度高于其阈值浓度 c^* 时, HEC 分子量越大,相邻 DNA 片段之间淌度差越大, HEC 浓度越高,其迁移淌度越低; (2)对于相邻的 DNA 片段, l_e 在一定范围内,其分离度随 l_e 增大而线性升高; (3)毛细管有效长度一定时, DNA 淌度随毛细管侧面积与截面积之比 R 增大而升高,分离效率提高; (4) BGE 温度升高, DNA 在筛分介质中扩散效应增强,迁移淌度变大,相邻 DNA 片段间分离度减小. 根据以上结论,在直流电场下毛细管电泳 $\phi \times 174$ -Hirc II 限制性酶切片段,并实现了其高分离度、快速分离.

关键词 毛细管电泳; 羟乙基纤维素; DNA

Capillary Electrophoresis of DNA in Hydroxyethylcellulose

Liu, Chenchen^a Li, Zhenqing^{*,a} Meng, Fanming^a Ni, Yi^a Dou, Xiaoming^a
Yamaguchi, Yoshinori^{b,a}^(a) Engineering Research Center of Optical Instruments and System, Ministry of Education, Shanghai Key Laboratory of Modern Optical System, School of Optical-Electrical and Computer Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093)^(b) Photonics Advanced Research Center, Osaka University, Osaka 565-0871)

Abstract Using hydroxyethylcellulose (HEC) solution as polymer matrix, this work systematically studied the separation performance of 100 base pairs (bp) DNA ladder (100~1500 bp) by direct current electric field capillary electrophoresis (CE). In the present paper, we systematically investigated the influence of polymer concentration and molecular weight of HEC, electric field strength (E), the effective length (l_e) and the shape of the capillary, the temperature of the background electrolyte (BGE) on the separation performance of DNA. Furthermore, we compared the migration of DNA in polymer with the non-gel sieving model. Results show that: (1) When the concentration of HEC is above the entangled threshold c^* , the mobility difference increases with the growth of molecular weight, whereas the mobility of DNA decreases with the rise of concentration of HEC. (2) The resolution of adjacent DNA fragments linearly increases with the effective length (l_e) of the capillary when l_e ranges from 4 to 12 cm. (3) The mobility of DNA increases with the growth of area ratio R ($S_{\text{lateral}}/S_{\text{section}}$), and thus the separation performance improves. (4) The increase of BGE temperature strengthens the diffusion effect of DNA, thus increases the mobility, and deteriorates the resolution. Based on the results above, we separated the $\phi \times 174$ -Hirc II digest by CE in an optimal electrophoretic condition. Experiment shows that rapid separation of $\phi \times 174$ -Hirc II digest was realized with high resolution. In our experiment, the fused-silica capillary is coated by acrylamide, and the background electrolyte (BGE) used for the sieving matrix contains $0.5 \times$ Tris-borate-EDTA (TBE) and $1 \times$ SYBR Green I. The DNA sample was injected for 2.0 s at an E of 100 V/cm. The self-built CE device involved is reliable and showed some remarkable achievements previously. Such a study is beneficial to the realization of rapid and effective separation of DNA, and allows deep insight into DNA migration in the polymer matrix under constant electric field.

Keywords capillary electrophoresis; hydroxyethylcellulose; DNA

* E-mail: zhenqingli@163.com

Received November 19, 2012; published December 25, 2012.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 21205078), Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education of China (No. 20123120110002), Teachers' Innovation Ability Construction of University of Shanghai for Science and Technology (No. GDCX-Y-1205), the Innovation Program of Shanghai Municipal Education Commission (No. 13YZ073), Shanghai Committee of Science and Technology (No. 10540500700) and the Innovation Fund Project For Graduate Student of Shanghai (No. JWCXSL1202), and partly supported by the Leading Academic Discipline Project of Shanghai Municipal Government (S30502).

国家自然科学基金(No. 21205078)、高等学校博士学科点专项科研基金博导类资助课题(No. 20123120110002)、上海理工大学教师创新能力建设(No. GDCX-Y-1205)、上海市教委科研创新项目(No. 13YZ073)、上海市科技发展基金(No. 10540500700)和上海市研究生创新基金(No. JWCXSL1202)资助项目. 本文部分受上海市重点学科项目第三期项目(S30502)资助.

1 引言

毛细管电泳作为一种高效的微分离分析方法,在分子生物学、临床医学及蛋白质与核酸分离分析等领域具有重要的应用价值^[1-3].按照分离介质的不同,毛细管电泳可分为凝胶筛分电泳和无胶筛分电泳.与凝胶电泳相比,无胶筛分电泳具有柱效高、易于制备、填充清洗操作简便、重复性高等特点,成为诸多学者研究的热点.常用的无胶筛分介质有线形均聚物[如纤维素衍生物,聚环氧乙烷(PEO),丙烯酰胺(LPA),聚*N,N*-二甲基丙烯酰胺(PDMA)]和共聚物等^[4].其中,纤维素衍生物能够有效地屏蔽硅烷醇基,减轻电泳过程中毛细管壁对样品的影响^[5,6].羟乙基纤维素(HEC)是纤维素衍生物的一种,常用于分离检测核酸物质,它不仅安全无毒性、化学性质稳定^[7],而且分子间相互交缠时形成的交链的硬度远远超过了PEO, LPA和PDMA^[8,9],具有很高的研究价值. Bashkin小组^[10]曾以HEC作为筛分介质,进行了基因的测序工作.李振庆等^[11]在HEC溶液中添加醋酸成功地实现了RNA的在线变性与分离.

本文以100~1500 bp DNA ladder为分离对象,对直流电场下在羟乙基纤维素溶液中毛细管电泳时DNA的分离特性研究做了详细研究,并在此基础上,采用毛细管电泳分离了限制性内切酶Hinc II作用过的 $\phi\times 174$ am 3 DNA片段,其结果对毛细管电泳快速分离小片段DNA具有重要的实验指导意义.

2 结果与讨论

2.1 HEC分子量对DNA分离的影响

图1显示了毛细管电泳时DNA淌度与分离度随筛

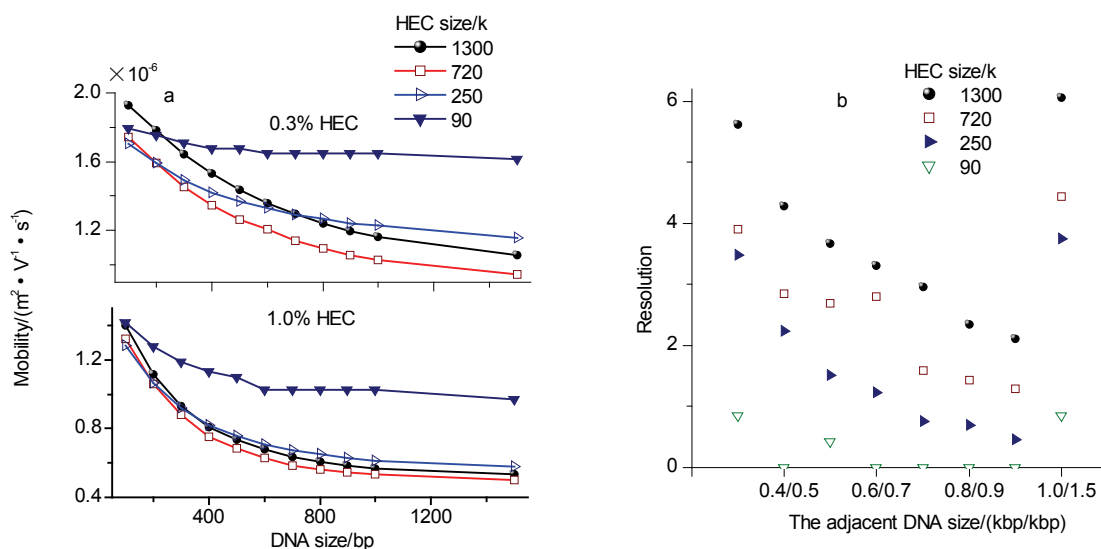


图1 HEC分子量对DNA分离效率的影响:(a)淌度;(b)0.3% HEC中DNA分离度.电泳条件,毛细管: $l_e/l_t=6/11$ cm; I.D./O.D.=75/360 μm ; 样品进样:100 V/cm (2.0 s); 电场强度:80 V/cm

Figure 1 The effect of molecular weight of HEC on the separation performance of DNA by CE, (a) mobility vs. DNA size; (b) resolution vs. DNA size in 0.3% HEC solution. Electrophoretic conditions: Capillaries: $l_e/l_t=6/11$ cm; I.D./O.D.=75/360 μm . Loadings: 100 V/cm (2.0 s); Electric field strength: 80 V/cm

分介质HEC分子量大小的变化关系.结果表明:(1)筛分介质浓度相同时,HEC分子量越大,相邻DNA片段之间淌度差越高;而HEC分子量相同时,筛分介质浓度越高,DNA在高浓度HEC中迁移淌度越低.(2)对于分子量为90 k的HEC筛分介质,当HEC浓度为1.0%时,仅能分离出小于500 bp DNA片段,即对于低分子量筛分介质HEC,若要实现宽范围DNA分离,需提升其浓度.这主要是由于当HEC浓度 c 达到一定阈值 c^* 时,HEC高分子链开始缠结并形成一定孔径的动态网络.而阈值浓度 c^* 取决于^[12,13]:

$$c^* \approx (1.5/K)M_w^{-a} \quad (1)$$

其中 M_w 为筛分介质分子量, K , a 是常数.由公式(1)可知,筛分介质分子量越小,对应阈值 c^* 越高.

2.2 HEC浓度对DNA分离的影响

图2显示了毛细管电泳时DNA淌度随凝胶浓度的变化关系.结果表明,对于同一分子量的筛分介质HEC,其浓度越高,DNA在筛分介质中迁移速度越慢.而且对于高浓度的HEC,相邻的大片段DNA淌度差较小.这主要是由于当筛分介质在缠结溶液中形成动态网络后,高分子链之间的平均距离 ξ 取决于^[4]:

$$\xi = 0.5R_g(c/c^*)^{-3/4} \quad (2)$$

其中 R_g 为聚合物分子的回转半径.由公式(2)可知,高分子链之间的平均距离 ξ 与筛分介质浓度有关,筛分介质浓度越高,对应的分子链与链之间距离 ξ 越小.

由图2可知,当HEC浓度由0.1%增至0.4%时,小于1500 bp的DNA片段能够被有效分离,且电泳峰较窄;随着HEC浓度继续升高,800~1000 bp范围内DNA分离度下降.根据Ogston筛分理论,0.15% HEC (1300

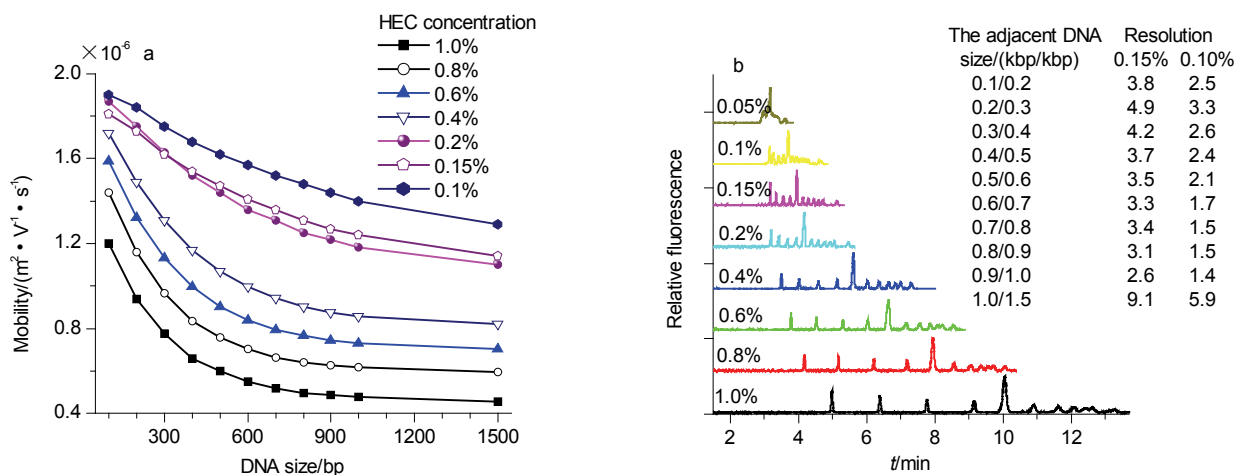


图2 HEC(1300 k)浓度对 DNA 分离效率的影响: (a)淌度; (b)电泳图谱. HEC 分子量为 1300 k, 其它实验条件与图 1 一致
 Figure 2 The effect of concentration of HEC (1300 k) on DNA separation by CE: (a) Mobility; (b) Electropherogram. The molecular weight of HEC is 1300 k, and other conditions are the same as those in Figure 1

k)分子链形成的筛网网络孔径是实现该范围 DNA 有效分离的最佳孔径, 当 HEC 浓度继续升高时, 筛网孔径变小, 较大的 DNA 分子很难通过该筛孔, 导致分离度降低.

2.3 电场强度对 DNA 分离的影响

图 3 显示了不同浓度 HEC 中 DNA 分离效率随电场强度变化状况. 由图 3a, 3b 发现, 电场强度越高, DNA 迁移时间越短, 且二者近似呈反比例变化关系. 带电粒

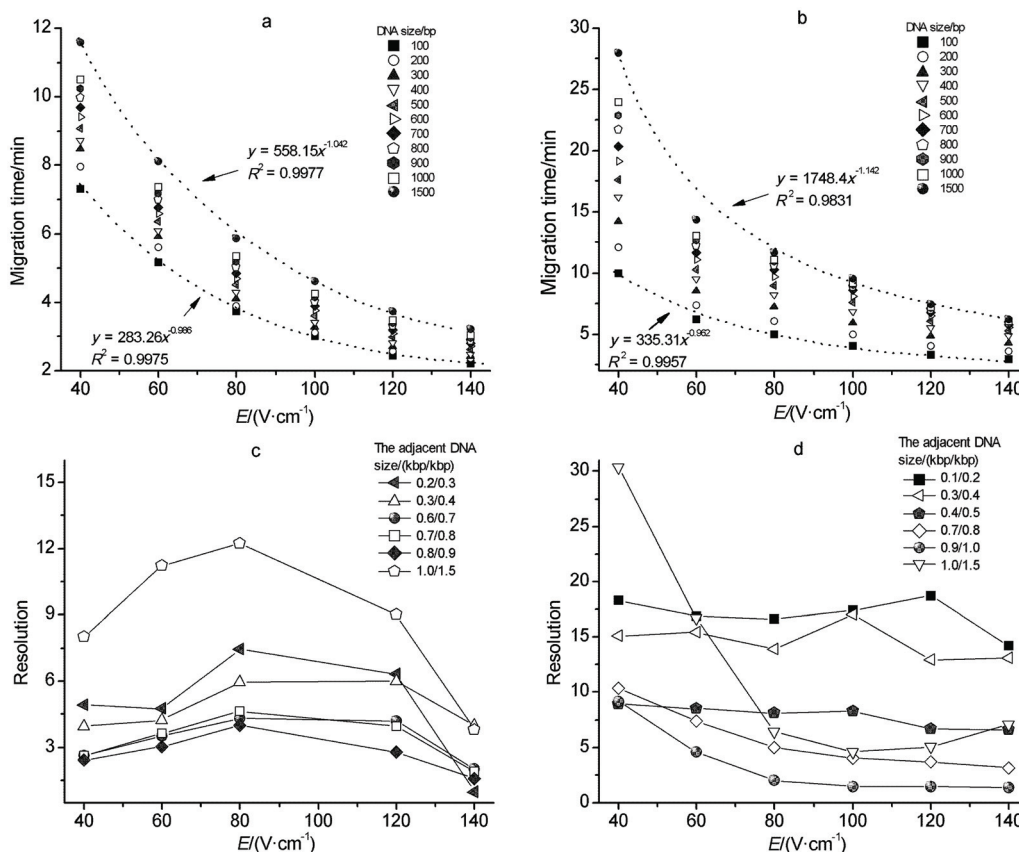


图3 电场强度对 DNA 分离效率的影响: (a) 0.15% HEC 中 DNA 迁移时间; (b) 0.7% HEC 中 DNA 迁移时间; (c) 0.15% HEC 中 DNA 分离度; (d) 0.7% HEC 中 DNA 分离度. HEC 分子量为 1300 k, 其他实验条件与图 1 一致
 Figure 3 The effect of electric field strength on the migration time of DNA in: (a) 0.15% HEC; (b) 0.7% HEC; and the resolution of DNA in (c) 0.15% HEC; (d) 0.7% HEC. The molecular weight of HEC is 1300 k, and other conditions are the same as those in Figure 1

子在流体中运动时, 溶剂阻力 F_f 与粒子运动速度 v 和溶剂粘度 η 成正比: $F_f = \eta v$, 带电量为 q 的粒子在电场作用下所受电场作用力为: $F_E = qE$, 当带电粒子在电场作用下运动稳定后: $F_f = F_E$, 可知: $v = qE/\eta$, 结合速度定义可知^[9]:

$$t = l_e \eta / qE \quad (3)$$

图 3a, 3b 从实验方面验证了迁移时间 t 和电场强度 E 之间的关系。

图 3c, 3d 显示了电场 80 V/cm 下, 在 0.15% 与 0.7% 不同浓度 HEC 中毛细管电泳分离 DNA 时对应分离度。结果表明: (1) HEC 浓度较低(0.15%)时, 电场强度在 40~80 V/cm 内分离度随着电场强度的升高而增大, 在 80~140 V/cm 内分离度随电场强度升高而减小; (2) HEC 浓度较高(0.7%)时, 小于 500 bp DNA 片段分离度随电场强度变化规律不明显, 大于 500 bp DNA 片段分离度随电场强度升高而降低。此外, 实验发现 DNA 电泳峰宽随着电场强度增大而变窄, 这主要是因为(1)电场强度增大, DNA 在毛细管内迁移速度增大; (2)凝胶内产生的热量与毛细管两端的电压成正比, 电压越高, 凝胶内产生的焦耳热越大, 从而凝胶的粘度越低。以上两个因素导致 DNA 经毛细管检测窗口时间缩短, 从而 DNA 电泳峰变窄。

2.4 毛细管有效长度对 DNA 分离的影响

理想状况下, 带电粒子在电场作用下运动时, 若电场强度一定, 则其迁移速度一定。毛细管电泳 DNA 时, 在相同的筛分介质中, 若毛细管上所加的电场强度一定, DNA 淌度与分离度随毛细管有效长度变化关系如图 4 所示。研究发现: (1)毛细管有效长度不同时, 对于小于 300 bp 的 DNA 片段, 其淌度值几乎重叠在一起, 而对于大于 300 bp 的 DNA 片段, 其淌度值差别较大, 这可能是由于 DNA 在筛分介质中的运动并不是一个质点运动, 由于 DNA 分子与筛分介质相互作用, 其形状与运动路径在不断变化, 并且这种变化具有一定的随机性, 导致其运动过程并非是一种理想的匀速运动, 于是在不同位置所测得的淌度呈现出一定的随机性变化。(2)对于同一组相邻的 DNA 片段, 其分离度随毛细管有效长度 l_e 增大而线性升高。这主要是由于毛细管两端电场强度一定, 在相同的介质中, 相邻的一组 DNA 片段速度差恒定, 毛细管长度越长, 其迁移时间越长, 因而相邻组分 DNA 间的峰距(迁移时间 \times 速度差)也就越宽。

2.5 毛细管内径形状对 DNA 分离的影响

图 5 显示了毛细管电泳时, 其它实验条件一定, DNA 分离效率随毛细管内径形状的变化关系。在本实验中, 我们选用的毛细管横截面分别为圆形(Circle)和正方形(Square), 其中圆形截面毛细管的内径(I.D.)分别为 75 μm 与 50 μm , 正方形截面的毛细管内截面边长为 50 μm 。经计算可知, 侧面积与截面积比 R 有: $R_{75 \mu\text{m circle}} < R_{50 \mu\text{m square}}$ 。由图 5 可以发现: 淌度、分离度、理论塔板数, 即 DNA 分离效率随着 R 减小而降低。这主要是由于当毛细管两端施加高压时, 毛细管内部散热效率与 R 正相关。 R 越小, 毛细管散热效率越低, 从而使筛分介质内部温度升高, DNA 在筛分介质内部扩散效应增强, 以致 DNA 检测峰宽增大, 最终导致毛细管电泳 DNA 分离效率降低。

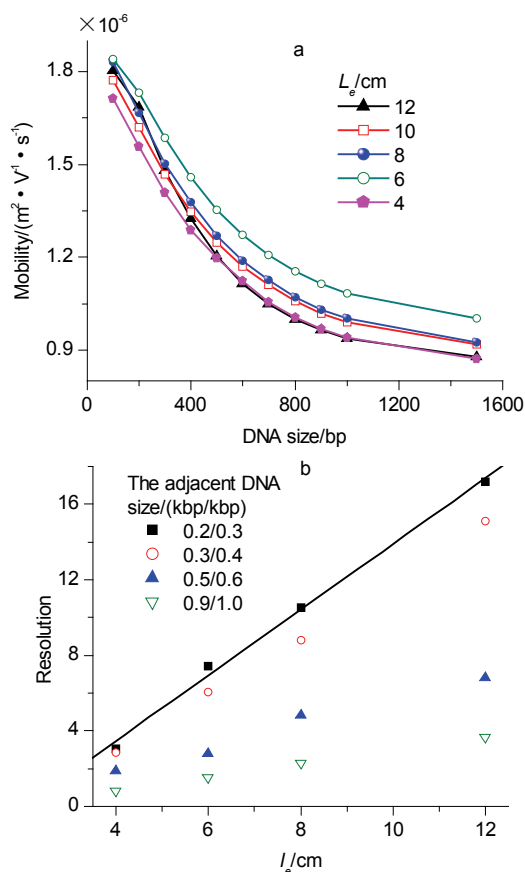


图 4 毛细管有效长度对 DNA 分离效率的影响: (a)淌度; (b)分离度。0.3% HEC(1300 k), 其他实验条件与图 1 一致

Figure 4 The effect of effective length l_e on the separation performance of DNA by CE: (a) mobility vs. DNA size; (b) resolution vs. l_e . The concentration of HEC (1300 k) is 0.3%, and other conditions are the same as those in Figure 1

$< R_{50 \mu\text{m circle}} < R_{50 \mu\text{m square}}$ 。由图 5 可以发现: 淌度、分离度、理论塔板数, 即 DNA 分离效率随着 R 减小而降低。这主要是由于当毛细管两端施加高压时, 毛细管内部散热效率与 R 正相关。 R 越小, 毛细管散热效率越低, 从而使筛分介质内部温度升高, DNA 在筛分介质内部扩散效应增强, 以致 DNA 检测峰宽增大, 最终导致毛细管电泳 DNA 分离效率降低。

2.6 背景电解液温度对 DNA 分离的影响

图 6 显示了毛细管电泳时, 其它实验条件一定, DNA 分离效率随背景电解液(BGE)温度变化规律。结果表明, BGE 温度越高, DNA 迁移淌度越大, 相邻 DNA 片段间分离度降低。这主要是由于随着温度升高, BGE 粘度降低, DNA 在凝胶中扩散效应增强所致。

2.7 毛细管电泳 $\phi \times 174$ -Hinc II digest

根据对毛细管电泳 DNA 分离特性的研究, 我们在电场强度 100 V/cm, 有效长度为 8.0 cm 条件下对限制性内切酶 Hinc II 作用过的 $\phi \times 174$ am 3 DNA 片段做了

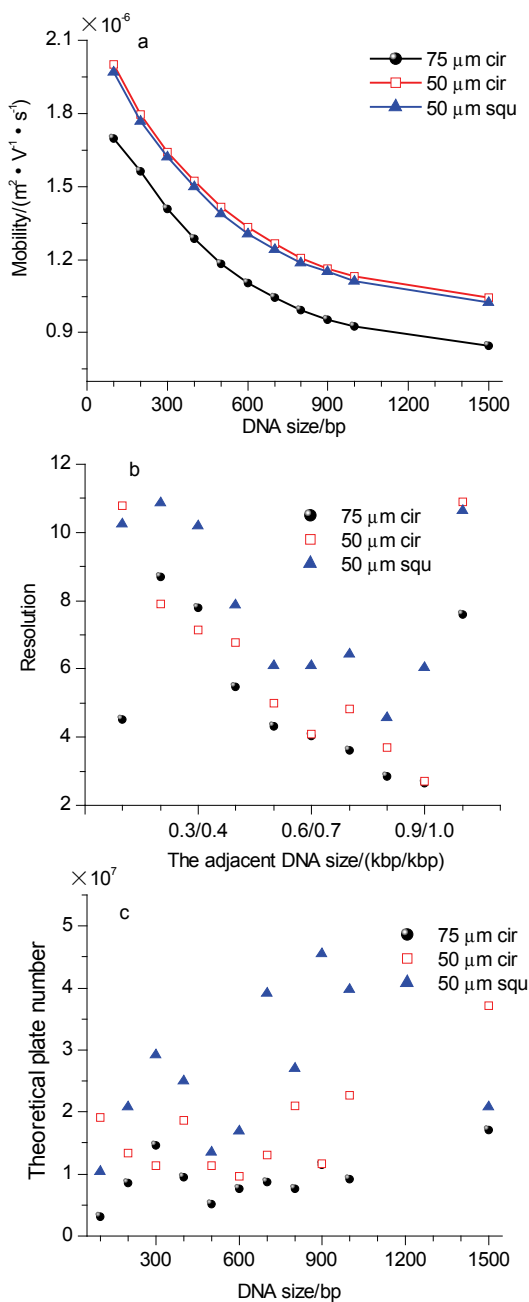


图 5 毛细管形状对 DNA 分离效率的影响: (a)淌度; (b)分离度; (c)理论塔板数. 0.3% HEC(1300 k), 其他实验条件与图 1 一致

Figure 5 The effect of capillary shape on separation performance of DNA by CE: (a) mobility vs. DNA size; (b) resolution vs. DNA size; (c) number of theoretical plate vs. DNA size. The concentration of HEC (1300 k) is 0.3%, and other conditions are the same as those in Figure 1

毛细管电泳分离, 实验结果如图 7 所示. 结果表明: 直流电场下可以实现毛细管电泳快速有效分离小于 1100 bp 的 DNA 片段. 对于 341/345 DNA 片段, 若要实现完全分离, 需进一步对电泳条件优化.

3 结论

毛细管电泳时, 筛分介质的挑选、背景电解液的制

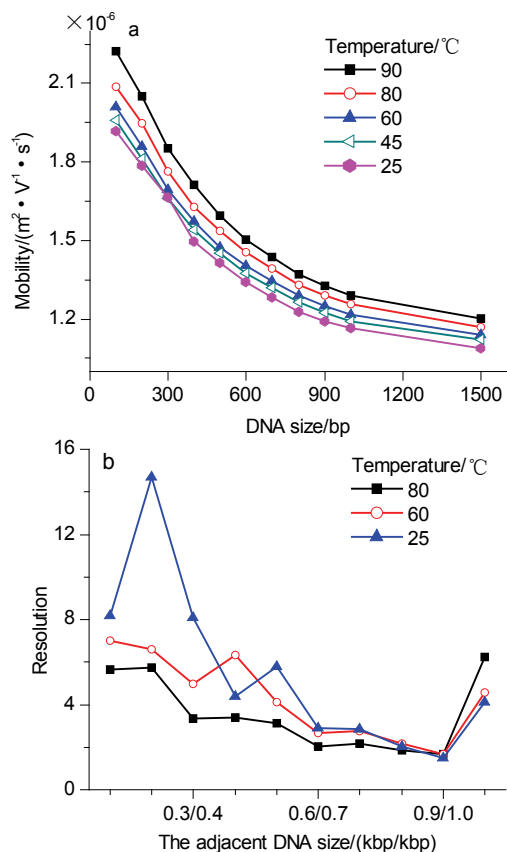


图 6 背景电解液温度对 DNA 分离效率的影响: (a)淌度; (b)分离度. 0.3% HEC (1300 k), 其他实验条件与图 1 一致

Figure 6 The effect of temperature of BGE on separation performance of DNA by CE: (a) mobility vs. DNA size, (b) resolution vs. DNA size. The concentration of HEC (1300 k) is 0.3%, and other conditions are the same as those in Figure 1

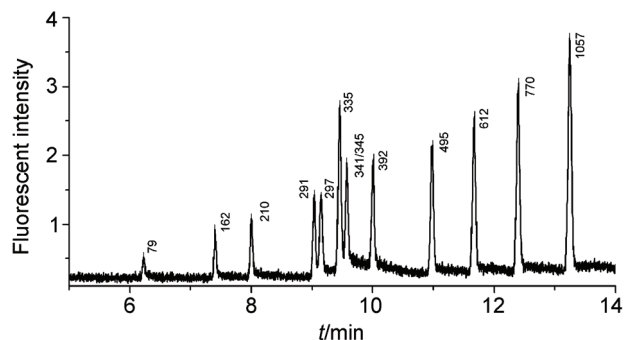


图 7 毛细管电泳分离 $\phi \times 174$ -Hirc II DNA marker. 电泳条件, 样品进样: 100 V/cm (1.0 s); 筛分介质: 1.0% HEC (250 k); 电场强度: 100 V/cm, 毛细管: $l/l_e = 14/8$ cm. 其他实验条件与图 1 一致

Figure 7 Separation of $\phi \times 174$ -Hirc II digest by CE. Electrophoretic conditions, Loadings: 100 V/cm (1.0 s); polymer: 1.0% HEC (250 k); electric field strength: 100 V/cm; capillary: $l/l_e = 14/8$ cm. Other conditions are the same as those in Figure 1

备以及电泳条件的选取, 是实现 DNA 快速有效分离的先决条件. 本文通过系列实验发现: (1)当 HEC 溶液的浓

度相同且远高于其阈值浓度 c^* 值时, 淌度与 HEC 分子量无关; HEC 分子量相同时, 筛分介质溶液浓度越高, 相邻 DNA 片段间淌度差越大, 从而有利于分离. (2) HEC (1300 k) 浓度低于 0.4% 时, 可以实现 1500 bp 范围内 DNA 片段的快速高效分离, 提高筛分介质浓度可以进一步提高小片段 DNA 的分离度. (3) DNA 在筛分介质中迁移时间随毛细管两端电压成反比例变化关系. (4) 一定范围内, 相邻片段间 DNA 分离度随毛细管有效长度呈线性变化. (5) 背景电解液温度越高, DNA 在筛分介质中扩散效应增强, 分离效率降低. 以上所取得的研究结论对快速有效分离 DNA 片段具有重要的指导意义.

4 实验部分

4.1 实验器材与实验条件

羟乙基纤维素(HEC, 美国 Sigma 公司), SYBR Green I(美国 Invitrogen 公司), $10 \times$ Tris-borate-EDTA (TBE)(美国 Bio-Rad 公司), 100 bp DNA ladder, $\phi \times 174$ -Hirc II digest 购于日本 Takara 株式会社. 其中 100 bp DNA ladder 在 $0.5 \times$ TBE 缓冲液中混合成 13 ng/ μ L 的样品, 4°C 保存.

采用实验室自制毛细管电泳系统^[14-16], 核心部件如下: 石英毛细管(美国 Polymimicro Technologies), 毛细管总长度/有效长度(l/l_e): 11/6 cm; 倒置显微镜 IX71(日本 Olympus); MODEL 610E 高压电源(美国 Trek); 汞灯光源发出的光经 U-MWIB-3 滤光片(日本 Olympus)过滤后产生波长为 460~495 nm 的激发光, 荧光经 60X 物镜 PlanApo/IR(日本 Olympus)之后收集于光电倍增管 R928(日本 Hamamatsu Photonics).

为降低电渗流, 根据文献[17, 18]方法, 采用线性聚丙烯酰胺对毛细管内壁做了改性处理, DNA 进样条件: 100 V/cm (2.0 s), DNA 电泳过程在 25°C 恒温下的暗室中完成.

4.2 实验方案

本文主要研究了 HEC 分子量、浓度、电场强度、毛细管有效长度、毛细管截面形状及缓冲液温度等因素对直流毛细管电泳 DNA 样品的影响.

(1) 电场强度 40~140 V/cm 下, 分别在分子量 90, 250, 720, 1300 k, 浓度 0.1%~1.0% HEC 中进行毛细管电泳 DNA; (2) 毛细管总长 14 cm, 有效长度 4~12 cm, 在浓度 0.3% HEC (1300 k), 电场强度 80 V/cm 下毛细管电泳 DNA; (3) 毛细管内径截面分别为 75 μm circle、50

μm circle、50 μm square 时, 在 HEC (1300 k), 电场强度 80 V/cm 下分别毛细管电泳 DNA; (4) 将电极槽内背景电解液水浴升温至 45, 60, 80, 90 $^\circ\text{C}$ 后, 在 HEC (1300 k), 电场强度 80 V/cm 下分别毛细管电泳 DNA.

4.3 毛细管电泳分离效率评价参数

在本论文中, 毛细管电泳时 DNA 分离效率, 即分离淌度(Mobility, μ)和分离度(Resolution, R)分别定义为:

$$\mu = v/E = l_e/(Et) \quad (4)$$

$$R = 16(t_A - t_B)/W_A + W_B \quad (5)$$

式中 v 为电泳时 DNA 在毛细管中迁移速度, E 为电泳时毛细管两端施加的电场强度, t , t_A , t_B 分别为对应电泳峰的检出时间, W_A , W_B 分别为 A, B 两个电泳峰的时间峰宽.

References

- [1] Cheng, H.; Chiou, S.; Liao, Y.; Chen, Y.; Wu, S. *Electrophoresis* **2011**, *32*, 2021.
- [2] Liu, Y.-Y.; Wang, R.; Jia, Z.-P.; Guo, Z.-Q.; Xin, X.-T. *Acta Chim. Sinica* **2009**, *67*, 323. (刘圆圆, 王荣, 贾正平, 郭志强, 辛晓婷, 化学学报, **2009**, *67*, 323.)
- [3] Dai, R.-J.; Zhang, S.; Li, F.; Xin, H.; Zai, J.-L.; Fu, R.-N. *Acta Chim. Sinica* **1998**, *56*, 594. (戴荣继, 张妹, 李方, 靳慧, 在峻岭, 傅若农, 化学学报, **1998**, *56*, 594.)
- [4] Zhou, D.; Wang, Y.-M. *Prog. Chem.* **2006**, *18*, 987. (周丹, 王延梅, 化学进展, **2006**, *18*, 987.)
- [5] Ueno, K.; Yeung, E. *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 1424.
- [6] McGregor, D.; Yeung, E. *J. Chromatogr. A* **1994**, *680*, 491.
- [7] Guo, X.; Xue, J.; Zhang, Y.; Lin, B.-C. *Prog. Biochem. Biophys.* **1995**, *22*, 403. (郭栩, 薛俊, 张岩, 林炳承, 生物化学与生物物理进展, **1995**, *22*, 403.)
- [8] Wang, R.; Liu, Y.; Jia, Z.-P.; Gao, L.; Xie, H.; Zhang, Q.; Guo, Z.-Q. *Conference Proceedings of the Sixth Northwest Chromatography Academic Report the 11th Gansu Province Annual Chromatography Meeting, The Sixth Northwest Chromatography Academic Report the 11th Gansu Province Annual Chromatography Meeting, 2010.* (王荣, 刘勇, 贾正平, 高岚, 谢华, 张强, 郭志强, 西北地区第六届色谱学术报告会甘肃省第十一届色谱年会论文集, 西北地区第六届色谱学术报告会甘肃省第十一届色谱年会, **2010**.)
- [9] Li, Z.-Q. *Ph.D. Dissertation*, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai, **2011**. (李振庆, 博士论文, 上海交通大学, 上海, **2011**.)
- [10] Bashkin, J.; Marsh, M.; Barker, D.; Johnston, R. *Appl. Theor. Electrophor.* **1996**, *6*, 23.
- [11] Li, Z.; Dou, X.; Ni, Y.; Sumitomo, K.; Yamaguchi, Y. *Electrophoresis* **2010**, *31*, 3531.
- [12] Viovy, J. L.; Duke, T. *Electrophoresis* **1993**, *14*, 322.
- [13] Heller, C. *Electrophoresis* **2001**, *22*, 629.
- [14] Li, Z.; Dou, X.; Ni, Y.; Chen, Q.; Cheng, S.; Yamaguchi, Y. *J. Chromatogr. A* **2012**, *1229*, 274.
- [15] Li, Z.; Dou, X.; Ni, Y.; Sumitomo, K.; Yamaguchi, Y. *J. Sep. Sci.* **2010**, *33*, 2811.
- [16] Chen, J.; Li, Z.-Q.; Ni, Y.; Liu, C.-C.; Dou, X.-M.; Yoshinori, Y. *Acta Chim. Sinica* **2012**, *70*, 2073. (陈进, 李振庆, 倪一, 刘晨晨, 窦晓鸣, 山口佳则, 化学学报, **2012**, *70*, 2073.)
- [17] Hjerten, S. *J. Chromatogr. A* **1985**, *347*, 191.
- [18] Schmalzing, D.; Piggee, C. A.; Foret, F. *J. Chromatogr. A* **1993**, *652*, 149.

(Cheng, B.; Lu, Z.)