

色谱技术丛书

化学工业出版社

# 毛细管电泳技术及应用

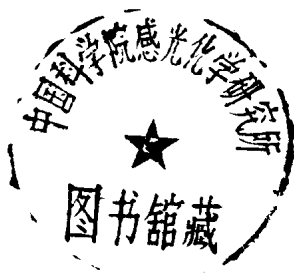
陈义 编著



色谱技术丛书

# 毛细管电泳技术及应用

陈 义 编著



化学工业出版社

· 北 京 ·

(京)新登字 039 号

**图书在版编目(CIP)数据**

毛细管电泳技术及应用/陈义编著. —北京:化学工业出版社, 2000

(色谱技术丛书/傅若农主编).

ISBN 7-5025-2959-4

I. 毛… II. 陈… III. 分析化学-毛细管电泳  
IV. 0657.7

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2000) 第 44901 号

---

色谱技术丛书  
**毛细管电泳技术及应用**  
陈 义 编著  
责任编辑:任惠敏  
责任校对:洪雅姝  
封面设计:于 兵

化学工业出版社出版发行  
(北京市朝阳区惠新里 3 号 邮政编码 100029)  
<http://www.cip.com.cn>

\*

新华书店北京发行所经销  
北京市燕山印刷厂印刷  
北京市燕山印刷厂装订

开本 850×1168 毫米 1/32 印张 7½ 字数 201 千字  
2000 年 9 月第 1 版 2000 年 9 月北京第 1 次印刷  
印 数: 1—4000

ISBN 7-5025-2959-4/TQ·1290

定 价: 18.00 元

---

**版权所有 违者必究**

该书如有缺页、倒页、脱页者, 本社发行部负责退换

## 序

色谱作为一种分离技术与方法，自本世纪初发表第一篇论文算起，已有 100 年的历史，虽然在前 30 多年间这种方法未受到应有的重视，但自 40 年代以后，逐渐得到发展，而且其势头越来越猛，从技术到理论，到各种分离模式，以及在各个科学领域内的应用，得到了突飞猛进的发展，现在已经成为分析化学学科中的一个重要分支。同时为许多重要学科的发展作出了极大的贡献。在人类进入 21 世纪之际，人们面临着在信息科学、生命科学、材料科学、环境科学等领域的快速发展的挑战，在这些领域人才的需求成为国家高度发展的至关重要的因素。而色谱技术是生命科学、材料科学、环境科学必不可少的手段和工具。根据最近的统计在全世界各类分析仪器中气相色谱仪和液相色谱仪的营销总额占 25%~30%。2000 年对各类分析仪器的需求量也以液相色谱仪最多。可以毫不夸张地说，如果没有色谱技术的应用，自然科学和生命科学能发展到今天的这个样子是很难想象的。

有关色谱的各种专著国内外已经出版了许多种，其中多是针对色谱专业人员而写的专著，而缺少一套系统的比较全面的介绍当代色谱技术的丛书，供广大的工厂企业中从事色谱分析的初中级技术人员和科研院所的科技人员，大专院校的研究生，甚至管理人员及有关领导学习参考的书籍。为此化工出版社提议，由北京理化分析测试学会组织编写了这套‘简明扼要，深入浅出，通俗易懂，新颖实用’的色谱技术丛书。这套书以傅若农教授为主编，汪正范教授和刘虎威副教授作副主编。为联系方便，主要请在京的专家来编写，并自 1998 年初开始运作。从方便读者学习角度出发，将色谱技术的主要内容分为 13 册。分别为：傅若农之《色谱分析概论》，刘国詮、余兆楼等之《色谱柱技术》，陈义之《毛细管电泳技术及应用》，于世林之《高效

液相色谱方法及应用》，刘虎威之《气相色谱方法及应用》，云自厚、张晓彤之《液相色谱检测方法》，吴烈钧之《气相色谱检测方法》，汪正范之《色谱定性与定量》，汪正范等之《色谱联用技术》，牟世芬、刘克纳之《离子色谱方法及应用》，何丽一之《平面色谱方法及应用》，王立之《色谱分析样品处理》，吴方迪之《色谱仪器维护与故障排除》。这些编著者多是我国目前在教学与科研第一线为色谱科学努力奋进的中青年专家，在书中都反映了色谱领域的基本知识、基本方法和他们自己的宝贵经验以及有关领域的最新成果。这套丛书将给初学色谱的年轻科技工作者提供较完整的学习参考书，也为大中专学生提供一套有用的教学参考书。还应该提出的是，由于得到了安捷伦科技有限（原中国惠普）公司的赞助，这套书的出版才能顺利进行。值此书即将付梓之际，特书此以为序。

周同惠

1999年9月9日

## 前 言

大约是在 1988 年初，就试图写一本关于毛细管电泳的小册子，当时国内外均无此类书籍。只因机缘未到，写作不到三章，计划便告流产。我们非晚国外五至十年实难成事。后来仅将那些初稿的一些要点投给《分析仪器》了事。从此跨洋越海，去看外国的月亮是否真的很圆，写作之事由此忘怀，不再思虑。

1994 年底回国后，国内的毛细管电泳研究已成蜂拥之势，按说正是著书立说的最佳时机，可惜我的冲动已失，劲头不在，况且大部头的专著在国外已有多册。尽管如此，写点什么的念头并未真正烟消云散，时不时会有意无意地收集和整理一些关于毛细管电泳的东西。

1998 年初，或是 1997 年底，突接傅若农先生的电话，邀我参加《色谱技术丛书》的编写工作，负责撰写《毛细管电泳技术及应用》这一册。可能是由于脑中潜伏已久的作书念头在作怪，我竟未加思索就一口应承了下来。过后才意识到问题的严重性——关于毛细管电泳的专著、手册，中文的英文的，应有尽有，我已没什么可写了。

答应了的事可不能反悔。我只好鼓起勇气，重新整理并补充早期的手稿和后来随手写的一些东西，这就构成了头七章。再把我和学生们做的实验结果以及平时讲课、作报告收集到的一些例子归纳起来，便组成了第八至第十一章。本来还要写一章关于定性定量分析方面的内容，但最终决定放弃，因为这些内容可照搬色谱中的方法，缺乏新意，多叨无益。

本册子前六章立意于毛细管电泳的基础，侧重思路、策略和方法的把握，不作严密的叙述和公式推导。后五章直接面对样品，颇有例题的味道，但仍未脱离“方法与思路”的框架。这里面有意重复了某些方面的内容，主要是为了兼顾只对某一章感兴趣的读者，同时也希望通读全册的朋友，对此能够加深印象。

本册子之能面世，是与国家自然科学基金委员会、中国科学院、分子科学中心及有关部门对我们研究工作的大力支持分不开的。书中所引的例子有许多来自国家杰出青年基金 (No. 29825112)、国家基金委“九五”重点基金 (No. 29575215) 和面上基金 (No. 29635020)、中国科学院“九五”重大 (No. KJ951-A1-507)、中科院院长基金和青年基金 (No. JQ-5-01、BH - 28 等)、国家人事部择优支持、国家教育部回国基金等项目。在写作过程中，我的学生王志欣、王珍帮助查阅和核对了第一、五、十一章中的部分文献，王志欣还通读了全文，郭晴同志帮助复印了部分谱图。谨此一并致谢！

希望本册子对专业和非专业研究人员都有参考价值，但限于水平，书中的错误和不妥之处在所难免，敬希读者不吝指正。

陈义

2000年2月于北京

# 色 谱 技 术 丛 书

傅若农 主编

汪正范 刘虎威 副主编

各分册主要执笔者:

- |               |     |     |     |     |
|---------------|-----|-----|-----|-----|
| 《色谱分析概论》      | 傅若农 |     |     |     |
| 《色谱定性与定量》     | 汪正范 |     |     |     |
| 《气相色谱检测方法》    | 吴烈钧 |     |     |     |
| 《液相色谱检测方法》    | 张晓彤 | 云自厚 |     |     |
| 《气相色谱方法及应用》   | 刘虎威 |     |     |     |
| 《高效液相色谱方法及应用》 | 于世林 |     |     |     |
| 《平面色谱方法及应用》   | 何丽一 |     |     |     |
| 《离子色谱方法及应用》   | 牟世芬 | 刘克纳 |     |     |
| 《毛细管电泳技术及应用》  | 陈 义 |     |     |     |
| 《色谱分析样品处理》    | 王 立 |     |     |     |
| 《色谱联用技术》      | 汪正范 | 杨树民 | 吴侔天 | 岳卫华 |
| 《色谱柱技术》       | 刘国铨 | 余兆楼 |     |     |
| 《色谱仪器维护与故障排除》 | 吴方迪 |     |     |     |



## 内 容 提 要

本书比较系统地介绍了毛细管电泳研究的原理、方法及其重要应用,具体内容涉及基本理论、仪器构成、分离条件选择、毛细管制作、电渗控制、手性分离以及离子、蛋白、DNA、糖、缀合物、颗粒物质和单细胞分析等,着重介绍如何利用毛细管电泳进行研究的思路与策略,可供分子生物学、基因组学、蛋白质组学、糖生物学、各种生物技术、生物化学、细胞学等生物或生命科学以及医药、食品、环境、公安侦破、农业、化学和化工等不同领域中的科学研究人员、研究生、教师、大学生、技术员和实验员参考。

中  
科  
学  
出  
版  
社

# 目 录

<b>第一章 绪论</b> .....	1
<b>第一节 概述</b> .....	1
一、毛细管电泳的沿革 .....	1
二、毛细管电泳发展新动向 .....	2
<b>第二节 电泳与色谱</b> .....	3
<b>第三节 毛细管电泳分离模式</b> .....	4
<b>第四节 毛细管电泳的特点</b> .....	5
<b>参考文献</b> .....	7
<b>第二章 毛细管电泳的基本理论</b> .....	9
<b>第一节 分离过程</b> .....	9
一、分离的一般过程 .....	9
二、数学描述 .....	10
<b>第二节 基础概念</b> .....	12
一、电泳、淌度、绝对淌度与有效淌度 .....	12
二、电渗、电渗率及合淌度 .....	14
三、两相分配与权均淌度 .....	16
四、分离模式新归属 .....	17
<b>第三节 分析窗口</b> .....	17
<b>第四节 理论效率及其表示</b> .....	18
一、效率方程 .....	18
二、峰加宽因素 .....	19
(一) 初始区带宽度 .....	19
(二) 分离加宽 .....	19
(三) 极限效率 .....	21
<b>参考文献</b> .....	22
<b>第三章 毛细管电泳仪器系统</b> .....	23
<b>第一节 毛细管电泳仪基本结构</b> .....	23

第二节 进样系统 .....	24
一、基本构成 .....	24
二、进样方法 .....	25
第三节 毛细管清洗和缓冲液填灌机构 .....	27
第四节 电源及其回路 .....	28
第五节 毛细管及其温度控制 .....	28
一、检测窗口制作 .....	29
二、温度控制 .....	29
第六节 检测及其数据记录与处理系统 .....	30
一、检测 .....	30
(一) 紫外吸收 .....	30
(二) 激光诱导荧光 .....	31
二、数据记录与处理 .....	35
参考文献 .....	36
<b>第四章 分离条件选择策略</b> .....	<b>38</b>
第一节 毛细管电泳模式的选定 .....	38
第二节 基本操作条件选择 .....	39
一、电泳电压 .....	39
二、电泳温度 .....	40
三、毛细管及其洗涤 .....	41
四、进样与聚焦进样 .....	42
(一) 电聚焦 .....	42
(二) pH 聚焦 .....	43
(三) 色谱浓集 .....	44
五、检测条件 .....	44
第三节 分离介质选择 .....	46
一、毛细管区带电泳介质选择 .....	46
(一) pH 及其缓冲试剂 .....	46
(二) 添加剂 .....	48
(三) 溶剂 .....	49
二、毛细管凝胶电泳与非胶筛分介质选择 .....	49
三、胶束电动毛细管色谱介质选择 .....	51
(一) 表面活性剂选择原则 .....	51

(二) 表面活性剂搜寻策略 .....	53
(三) 胶束修饰及其他 .....	53
四、其他模式的介质选择 .....	54
第四节 条件选择流程 .....	55
参考文献 .....	56
<b>第五章 毛细管制作技术 .....</b>	<b>58</b>
第一节 涂层技术 .....	58
一、动态吸着方法 .....	58
二、物理涂布技术 .....	59
三、化学涂层技术 .....	60
(一) 活性基团引入 .....	60
(二) 引入目标涂层试剂 .....	62
四、溶胶-凝胶技术 .....	64
五、吸附-化学交联 .....	65
第二节 凝胶毛细管制备 .....	65
一、基本问题 .....	65
二、解决策略 .....	66
三、琼脂糖凝胶毛细管的制备 .....	66
四、聚丙烯酰胺凝胶毛细管的制备 .....	67
(一) 基础 .....	67
(二) 高压灌胶 .....	69
(三) 等速电泳灌胶法 .....	70
(四) 低压控温悬挂聚合灌胶法 .....	70
五、梯度聚丙烯酰胺凝胶毛细管制备 .....	72
第三节 电色谱毛细管的制备 .....	74
一、柱塞制作方法 .....	74
二、填充柱的制备 .....	75
第四节 特殊技术 .....	76
参考文献 .....	78
<b>第六章 电渗控制 .....</b>	<b>80</b>
第一节 理论控制方法 .....	80
第二节 实用控制方法 .....	81
一、添加剂法 .....	81

(一) 增粘剂 .....	82
(二) 阳离子 .....	82
(三) 两性有机离子及中性有机物 .....	84
二、管壁涂层法 .....	85
第三节 外加电磁场控制法 .....	86
一、电场控制装置 .....	86
二、电渗的单电源四电极控制 .....	89
(一) 控制原理 .....	89
(二) 控制结果 .....	91
第四节 电渗电场控制的理论与结论 .....	94
第五节 电渗控制在分离中的应用 .....	97
第六节 常用电渗测定方法 .....	99
参考文献 .....	100
<b>第七章 手性分离</b> .....	<b>103</b>
第一节 毛细管电泳手性分离原理 .....	103
一、手性分离基本策略 .....	103
二、手性消除 .....	103
三、构建手性环境 .....	104
(一) 毛细管区带电泳 .....	105
(二) 胶束电动色谱 .....	107
(三) 毛细管凝胶电泳 .....	109
(四) 毛细管电色谱 .....	110
第二节 分离条件选择 .....	110
一、基本原则 .....	110
二、选择策略 .....	111
第三节 手性毛细管电泳的应用与发展动向 .....	115
参考文献 .....	117
<b>第八章 蛋白质分析</b> .....	<b>119</b>
第一节 基本概念 .....	119
一、蛋白质的淌度 .....	120
二、等电点 .....	121
三、吸附 .....	121
第二节 蛋白质的吸附与控制 .....	121

一、管壁惰化处理 .....	122
二、样品处理 .....	122
三、缓冲液处理 .....	123
第三节 蛋白质的尺寸分离 .....	124
一、筛分介质的选择 .....	124
二、缓冲体系的选择 .....	127
三、其他条件 .....	130
第四节 蛋白质等电聚焦 .....	130
一、一步法 .....	131
二、两步法 .....	131
第五节 蛋白质的亲和毛细管电泳 .....	132
一、基本原理 .....	132
二、基本方法 .....	132
第六节 微量制备 .....	133
一、单次收集 .....	134
二、多次重复收集 .....	134
三、多次收集-单次纯化 .....	134
第七节 应用举例 .....	134
一、促红细胞生成素肽谱(指纹图) .....	134
二、分子量测定 .....	136
三、等电点测定 .....	139
四、其他应用 .....	140
参考文献 .....	141
<b>第九章 DNA 及其碎片分析 .....</b>	<b>143</b>
第一节 DNA 及其片段分离基础 .....	143
一、毛细管电泳模式选择 .....	143
二、筛分介质 .....	144
三、缓冲体系 .....	145
四、样品处理、进样和检测方法 .....	147
第二节 基本应用 .....	148
一、核苷酸分析 .....	148
二、寡聚核苷酸与单链 DNA(ssDNA)片段分离 .....	151
三、双链 DNA(dsDNA)分离 .....	154

(一) 小片段 dsDNA 分离与应用 .....	154
(二) 大片段 DNA (>2kbp) 分离 .....	159
第三节 DNA 测序 .....	160
一、DNA 测序战略 .....	160
二、DNA 比长测序原理 .....	160
三、毛细管电泳测序基本流程 .....	163
参考文献 .....	169
<b>第十章 糖及其缀合物分析</b> .....	<b>172</b>
第一节 概述 .....	172
一、糖的分类 .....	172
二、糖分析的问题及其进展 .....	172
第二节 糖 CE 的基本策略——使糖带电 .....	173
一、络合带电 .....	173
二、强碱电离 .....	176
三、衍生带电 .....	176
第三节 糖的检测 .....	177
一、非衍生糖的检测 .....	177
(一) 电化学检测 .....	177
(二) 紫外-可见吸收检测 .....	178
(三) 荧光或激光诱导荧光检测 .....	179
二、糖的衍生 .....	179
第四节 糖的电泳分离 .....	182
一、基本分离条件 .....	182
二、单糖电泳 .....	182
三、寡糖电泳 .....	184
第五节 糖缀合物的电泳分离 .....	186
一、神经节苷脂的分离 .....	186
二、糖蛋白微观不均一性分析 .....	191
参考文献 .....	199
<b>第十一章 小离子与大细胞分离</b> .....	<b>201</b>
第一节 红细胞电泳 .....	201
一、背景 .....	201
二、红细胞的特点与电动原理 .....	202

三、红血球的制备 .....	203
四、电泳操作 .....	203
五、基本结果 .....	204
六、血红细胞电泳的问题与克服方法 .....	206
七、其他颗粒物电泳 .....	207
第二节 单细胞分析 .....	207
一、单细胞进样技术 .....	208
(一) 插入(打孔)取样 .....	208
(二) 整细胞进样 .....	210
二、应用实例 .....	211
(一) 单巨细胞 5-羟色胺的释放和残留测定 .....	211
(二) 单细胞氨基酸柱上衍生 CE 分析 .....	212
第三节 小离子电泳 .....	213
一、检测 .....	213
(一) 直接检测 .....	213
(二) 间接紫外检测 .....	216
二、结束语 .....	218
参考文献 .....	219
<b>符号表 .....</b>	<b>222</b>



# 第一章 绪 论

## 第一节 概 述

毛细管电泳 (CE) 又称高效毛细管电泳 (HPCE) 或毛细管电分离法 (CESM), 是一类以毛细管为分离通道、以高压直流电场为驱动力的新型液相分离分析技术, 它迅速发展于 80 年代中后期。毛细管电泳实际上包含电泳、色谱及其交叉内容, 是分析科学中继高效液相色谱之后的又一重大进展, 它使分析科学得以从微升水平进入纳升水平, 并使单细胞分析, 乃至单分子分析成为可能。长期困扰我们的生物大分子如蛋白质的分离分析也因此有了新的转机。

### 一、毛细管电泳的沿革

毛细管电泳方法虽新, 但历史久远。以毛细管等速电泳 (CITP) 的发展为起点可以上溯到 1960 年代甚至更远<sup>[1]</sup>; 多数学者以毛细管区带电泳 (CZE) 的出现为起点, 即便如此, 其历史亦可上溯到 1960 年代中期<sup>[2~3]</sup>。

CZE 是瑞典科学家 Hjerten 首先提出的<sup>[4]</sup>。他用壁涂甲基纤维素的 3mmID (内径) 石英管进行电泳分离, 为锐化区带, 他令管子绕轴旋转。此法构思奇巧, 可惜操作麻烦, 难以实用。1970 年, Everaerts 等报道其在 CITP 系统上得到的 CZE 结果<sup>[5]</sup>, 但效率不足以引人关注。1974 年 Virtanen 认为必需使用细毛细管方能提高分离效率<sup>[6]</sup>, 此观点为 Mikkers 等于 1979 年所证实<sup>[7]</sup>。Mikkers 等一方面从理论上研究了影响 CZE 效率的电场聚焦现象, 一方面在实验上用 200 $\mu\text{m}$  ID 的聚四氟乙烯管为分离通道, 获得了小于 10 $\mu\text{m}$  板高的空前效率<sup>[7]</sup>, 这是 CZE 发展史中的第一个重大突破。1981 年, Jorgenson 和 Lukacs 使用 75 $\mu\text{m}$  ID 的熔融石英毛细管做 CZE, 利用电迁移进样和荧光检测, 在 30kV 电压下产生了  $4 \times 10^5$  片/m 的效率<sup>[8]</sup>, 成为毛细管电泳发展史上

1108012