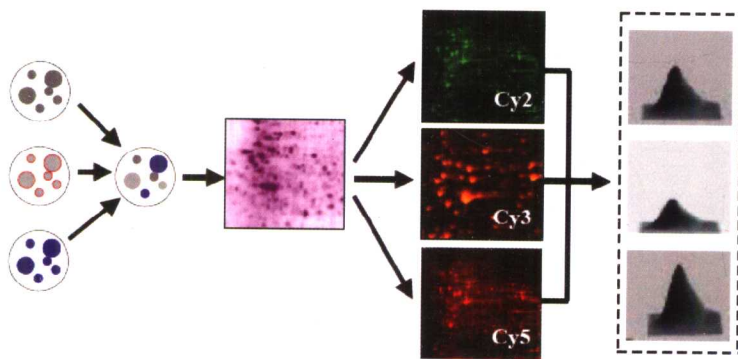


生物分析化学

鞠焯先 邱宗荫 丁世家 等 著



12.1
814



国家自然科学基金创新研究群体项目
(20521503)资助出版

现代化学基础丛书 13

生物分析化学

鞠焯先 邱宗荫 丁世家等 著

科学出版社

北京

内 容 简 介

生物分析化学作为分析化学与生命科学交叉过程中形成的一个新的学科分支,自 20 世纪 90 年代以来取得了迅速发展,已经成为生命科学研究中的重要组成部分。光谱、色谱、质谱、电分析化学、电泳以及它们的联合应用构成了生命科学研究中不可或缺的技术平台。对生命体系自身的各种化学、物理和生物过程的研究,将在更大程度上依赖于新的分析测试和表征技术、方法的建立与发展。

本书概括了十多位作者在生物分析化学相关领域十多年来的教学实践和科学研究经验和成果,对生物分析化学新技术进行了全面、系统、深入浅出的阐述,并对各方面的应用做了详细介绍。

全书分 14 章,内容包括生物分子的结构与分析、生物样品的制备、液相色谱技术、电泳技术、生物质谱分析法、微流控分析、免疫分析与印迹技术、生物传感与 DNA 阵列、核酸扩增和序列分析、蛋白质、多肽的氨基酸组成及序列分析、蛋白质组分析、代谢组学、生物信息学、细胞分析化学方面。

本书适合于从事生命科学、化学、环境科学及材料科学领域的科技工作者,可用作大专院校临床检验诊断学、生物化学、化学专业高年级学生,以及分析化学、药物分析、生物化学、食品化学及相关专业研究生的教学参考书或教材。

图书在版编目(CIP)数据

生物分析化学 / 鞠焯先等著. —北京: 科学出版社, 2007

(现代化学基础丛书 13)

ISBN 978-7-03-018349-1

I. 生… II. 鞠… III. 生物化学-化学分析 IV. Q5

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2007)第 028650 号

责任编辑: 黄 海 李久进 沈晓晶 / 责任校对: 钟 洋

责任印制: 钱玉芬 / 封面设计: 陈 敬

科学出版社出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码: 100717

<http://www.sciencep.com>

新蕾印刷厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2007 年 3 月第 一 版 开本: B5(720×1000)

2007 年 3 月第一次印刷 印张: 41 1/4

印数: 1—3 000 字数: 794 000

定价: 78.00 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换〈环伟〉)



鞠焜先 1964年11月生
于江苏靖江。1992年获南京
大学博士学位, 1999年聘为
教授、博士生导师、分析化
学教研室主任。1996~1997
年在加拿大Montreal大学做
博士后研究, 1999~2000年
在爱尔兰和德国的3所大学任
访问教授。曾任国际传感器

科学研讨会(巴黎)学术委员, 第二届国际传感器科学
研讨会执行主席, *Sensors*执行主编。兼任*Analytical
Letters*、《中国化学》、《分析化学》、《分析科学
学报》、《药学报》、《化学传感器》和《分
析实验室》编委, 江苏省化学化工学会分析化学专
业委员会主任, 中国仪器仪表学会化学传感器专业
委员会副主任, 中国分析测试协会青年学术委员会
副主任, 重庆医科大学兼职教授、博士生导师。

研究方向为生物分析化学与分子诊断, 包括纳
米生物技术, 功能生物传感, 芯片分析, 免疫、细
胞和基因分析及临床检验技术等。完成各类基金项
目近20项。发表论文230余篇, 专著3部, 英文专章
6章, 专利10件, 成果被SCI刊物他引1600多次。曾
获2001年江苏省青年科学家奖、2001年中国高校科
学技术一等奖、1996年中国化学会青年化学奖和教
育部科技进步三等奖2项。2003年获国家杰出青年科
学基金, 2005年成为国家创新研究群体科学基金项
目负责人。



邱宗荫 1941年7月生，陕西西安人。1963年毕业于西南师范学院化学系，1982~1984年在日本京都大学做访问学者。重庆医科大学省、部共建临床检验诊断学重点实验室教授，药学院教授，博士

生导师，重庆市首届学术带头人。现担任国务院学位委员会学科评议组成员，中国药学会理事，中国色谱学会理事，重庆分析测试学会理事长，重庆药学会理事长。主要研究方向为药物及临床蛋白质组学、生物活性分子的手性色谱分离、新药的分子药理学研究等。发表论文110余篇，主编、参编著作4部，发明专利3件。主持国家自然科学基金、教育部博士点基金、重庆市重大科技攻关项目等。



丁世家 1963年11月生于湖北嘉鱼。1984年获四川大学理学学士学位，1989年获南京大学理学硕士学位，2005年获重庆医科大学临床检验诊断学博士学位。重庆医科大学省、部共建临床检验诊断

学重点实验室教授，硕士生导师。目前担任重庆分析测试学会医学检测专业委员会秘书长。主要从事体内活性物质和药物的分析方法以及临床蛋白质组学研究。以第一作者和通信作者发表论文20余篇。

《生物分析化学》编写人员

第1章	刘北忠	鞠焯先
第2章	邱宗荫	
第3章	邱峰	
第4章	于超	
第5章	丁世家	
第6章	夏兴华	何风云
第7章	鞠焯先	欧阳瑞燭
第8章	刘松琴	鞠焯先
第9章	尹一兵	罗进勇
第10章	丁敏	易钢
第11章	邱宗荫	颜玉蓉
第12章	丁敏	张晓清
第13章	马永平	邱宗荫
第14章	鞠焯先	丁霖

前 言

分析化学是人们获得物质组成和结构信息的科学,这些信息对于生命科学、材料科学、环境科学和能源科学来说都是必不可少的。

生物分析化学作为分析化学与生命科学交叉过程中形成的一个新的学科分支,自 20 世纪 90 年代以来取得了迅速发展,已经成为生命科学研究中的重要组成部分。光谱、色谱、质谱、电分析化学、电泳以及它们的联合应用构成了生命科学研究中不可或缺的技术平台,在核酸、蛋白质、多肽、糖与外源性及内源性生物小分子的研究中发挥着越来越重要的作用。同时,生物分析化学的研究成果,又极大地丰富了传统分析化学的内涵,促进了它的快速发展。对人类健康和社会经济发展产生重大影响的人类基因组计划,就是因为首先重视了分析测试方法学,尤其是建立和发展了快速、准确、高通量的基因测序方法,才从根本上保证了这一科学工程的提前完成。可以说,基因检测的研究带动了 20 世纪整个生命科学的迅速发展。另一个例子是 1990 年 Manz 在硅片上组装微型液相色谱装置,形成了微全分析系统(μ TAS)研究领域。该技术反映了分析检测的微型化、集成化、整体化和自动化的发展趋势,在短短的十余年中已发展成为当前世界科技前沿领域之一,在生命科学研究领域中也日益受到重视。

21 世纪是生命科学的时代,生命科学的发展为分析化学的发展提供了前所未有的机遇和挑战。对生命体系自身的各种化学、物理和生物过程的研究,将会在更大程度上依赖于新的分析测试平台的建立与发展。从分子水平上进行人类疾病相关基因和蛋白质的识别与鉴定、疾病相关基因和蛋白质的结构与功能研究、与疾病防治有关的基因和蛋白质表达的调控、环境致毒元素的致毒机制的阐明与控制、新型药物的药理与代谢机制的研究等都迫切需要新的分析测试方法与表征技术来获取生命物质形成和转化过程中的相关信息。但是,由于生命体系在组成和相互作用两个方面的高度复杂性,生命科学研究也向生物分析化学提出了苛刻的要求。高分辨率的分离技术,超高灵敏度、宽动力学范围的检测技术,实时、原位的表征技术,生物分子相互作用的解析技术等将是今后生物分析化学的重要发展方向。因此,生物分析化学已成为当今分析化学学科的重要前沿领域与多学科、多技术交叉的会聚点。

当今,美国、英国、德国、法国和日本等世界强国为争取 21 世纪战略格局的主动权,正在进行一场以生命科学前沿研究和生物高技术为中心之一的竞争和较量。竞争的核心首先是生命科学的测试技术与装备,因为它是生命科学领域一切原始

性创新的源头和基础。

由于在生命分析测试技术方面的相对劣势,我国在生命科学的研究中往往不得不依赖国外先进的检测技术。这种依赖发达国家的情况难免会让我国成为世界生命科学与技术强国之路困难重重。改变这种状况的根本措施之一是培养新一代具有创新能力的年轻的生物分析化学专门人才。为此,我们根据自身的科研工作积累,围绕因生命科学研究需要而发展起来的相关新技术编写了本书,希望通过本书能够系统、完整地介绍生物分析化学的内容和进展。一方面,可以帮助生命科学相关专业的科技工作者熟悉现代分析化学的理论和方法,以及在具体的研究工作中提高运用这些理论和方法的能力;另一方面,也有助于化学专业的科技工作者运用分析化学的基础理论和方法去认识和解决生命科学领域中各种生物活性物质定性、定量问题。

本书介绍了生物分析化学的基础知识、基本方法和近十多年来的发展,综述了分析化学与材料科学、信息科学、生命科学等学科的交叉、渗透,内容涉及生物分析化学的各个前沿领域,包括生物技术和纳米材料科学,以及医疗卫生、临床检验等领域,涉及生物物质的结构和性质,生物样品的制备、分离与分析方法,微流控分析,分子识别,蛋白质组学,代谢组学,生物信息学和细胞分析化学等方面。全书结合了作者们在多个领域研究的心得与成果,其中不乏原创性成果,内容深入浅出,对生命科学、信息科学、材料科学、环境科学等研究领域与临床检验诊断学的发展均具有重要的学术价值。

本书由重庆医科大学医学检验系、南京大学生命分析化学教育部重点实验室和东南大学化学化工学院部分专家共同完成,在此我们对他们的贡献表示感谢!在本书出版之际,我们要感谢国家自然科学基金委员会对相关研究工作给予的资助!

由于我们的水平有限,经验不足,且该领域的发展极快,错误及不妥之处在所难免,恳请读者批评指正。

鞠焜先 邱宗荫 丁世家

2006年5月18日于重庆

目 录

前言

第 1 章 生物分子的结构与分析	1
1.1 氨基酸、多肽与蛋白质.....	1
1.2 核酸.....	12
1.3 糖.....	19
1.4 生物分子的分析化学.....	23
参考文献	26
第 2 章 生物样品的制备	27
2.1 生物分析化学分析对象的复杂性.....	27
2.2 生物材料的选择.....	29
2.3 激光捕获显微切割技术.....	29
2.4 细胞的破碎.....	32
2.5 生物大分子的提取.....	34
2.6 生物大分子的分离与纯化.....	36
2.7 固相萃取与固相微萃取.....	48
参考文献	53
第 3 章 液相柱色谱技术	54
3.1 液相柱色谱分析的基本原理.....	54
3.2 描述色谱过程的速率理论.....	58
3.3 HPLC 系统	61
3.4 液相色谱分离模式.....	66
3.5 整体色谱柱.....	92
参考文献	95
第 4 章 电泳技术	96
4.1 电泳的基本原理.....	97
4.2 琼脂糖凝胶电泳	102
4.3 聚丙烯酰胺凝胶电泳	106
4.4 自由流电泳	126
4.5 毛细管电泳	127
参考文献.....	149

第 5 章 生物质谱分析法	151
5.1 质谱仪	151
5.2 质谱联用技术	175
5.3 生物质谱的应用	179
参考文献.....	197
第 6 章 微流控分析	199
6.1 微全分析系统和微流控分析概述	199
6.2 微流控芯片上的生物分析化学技术	201
6.3 微流控分析在生物分析化学中的应用	234
参考文献.....	240
第 7 章 免疫分析与印迹技术	246
7.1 抗原-抗体反应的基本原理.....	246
7.2 可见性免疫反应及其分析应用	249
7.3 标记免疫分析	254
7.4 免疫组织化学与免疫印迹技术	263
7.5 免疫分析的发展与新技术	268
7.6 印迹技术	272
7.7 分子印迹聚合物的设计、制备与选择性.....	280
7.8 分子印迹技术的应用	290
7.9 分子识体	301
7.10 分子识体的应用.....	306
参考文献.....	322
第 8 章 生物传感与 DNA 阵列	328
8.1 生物传感器的基本原理	328
8.2 电子传递媒介体生物传感器	336
8.3 无试剂生物传感器	338
8.4 生物传感器的应用	343
8.5 DNA 生物传感器.....	358
8.6 DNA 阵列.....	369
参考文献.....	381
第 9 章 核酸扩增和序列分析	387
9.1 核酸的提取和分离	387
9.2 核酸的体外扩增——聚合酶链反应	390
9.3 核酸测序	409
参考文献.....	421

第 10 章 蛋白质、多肽的氨基酸组成及序列分析	422
10.1 氨基酸的衍生化间接分析法.....	422
10.2 氨基酸直接分析法.....	436
10.3 氨基酸的液质联用分析.....	440
10.4 氨基酸立体异构体的手性色谱分析.....	443
10.5 肽和蛋白质的直接测序法.....	452
10.6 蛋白质测定序列前的样品处理.....	467
10.7 蛋白质测序技术平台.....	470
参考文献.....	471
第 11 章 蛋白质组分析	473
11.1 蛋白质组与基因组.....	473
11.2 蛋白质组学研究对生物分析化学提出的挑战.....	475
11.3 蛋白质组学的分析策略与研究路线.....	479
11.4 双向电泳技术及其改进.....	481
11.5 蛋白质组学分析中的色谱技术及几种分离技术的“杂交”.....	496
11.6 生物质谱在蛋白质组学分析中的应用.....	500
11.7 定量蛋白质组学技术.....	515
11.8 表面增强激光解析电离飞行时间质谱技术.....	519
11.9 表面等离子共振技术.....	524
参考文献.....	529
第 12 章 代谢组学	531
12.1 代谢组学的研究方向.....	531
12.2 代谢组学的研究方法.....	535
12.3 展望.....	550
参考文献.....	550
第 13 章 生物信息学	552
13.1 生物信息学的概念.....	552
13.2 重要的生物信息学数据库.....	552
13.3 搜索引擎——ExPASy	562
13.4 DNA 序列分析应用举例	567
13.5 蛋白质序列分析应用举例.....	573
13.6 蛋白质组学研究中的数据分类.....	576
参考文献.....	583
第 14 章 细胞分析化学	584
14.1 细胞毛细管电泳分析.....	584

14.2 细胞图像分析.....	594
14.3 微电极实时动态检测单细胞.....	615
14.4 细胞电化学与细胞传感.....	622
参考文献.....	640

第 1 章 生物分子的结构与分析

生物体内的各种有机分子均称生物分子(biomolecule),包括蛋白质、核酸、糖、脂类、维生素与激素等。按其相对分子质量大小,可分为生物小分子和生物大分子。其中,多糖、蛋白质与核酸是分别由多个基本结构单位——单糖、氨基酸和核苷酸,按照一定的排列顺序和连接方式而形成的重要的生物大分子^[1]。本章主要介绍蛋白质、核酸和糖的结构与性质,生物分子的结构和性质特点与差异是人们对其进行分离与分析的基础。只有在充分认识其结构与性质的基础上,才可以建立各种生物分析化学的方法和技术,并通过这些方法和技术,对其做进一步的研究和深入的了解。

1.1 氨基酸、多肽与蛋白质

蛋白质是生物功能的主要载体,而氨基酸是肽和蛋白质组成的结构单位,相对分子质量在 100~200 之间,在生物体代谢过程中起重要作用。从各种生物体中发现的氨基酸现已有 180 多种,但是参与肽与蛋白质组成的常见氨基酸只有 20 种,而且都是 α -氨基酸。这 20 种不同氨基酸通过肽键相连,并排列组合形成成千上万种的肽和蛋白质。一般来讲,10 个以内的氨基酸组成的短链称寡肽,10 个以上的氨基酸组成的短链称多肽,而上千个氨基酸组成的长链称蛋白质。氨基酸的排列顺序决定了多肽和蛋白质的结构和功能。

1.1.1 氨基酸

自然界中存在的成千上万种蛋白质^[2],在结构和功能上的惊人的多样性归根结底是由于 20 种常见氨基酸的内在性质、排列顺序和空间结构的差异造成的。这些性质包括:①聚合能力;②特有的酸碱性质;③侧链的结构及其化学功能的多样性;④手性(甘氨酸除外)。

氨基酸的基本结构(图 1.1)是由碳原子(α -C)连接 4 个不同的基团形成的四面体。4 个基团分别为:氨基($-\text{NH}_2$)、羧基($-\text{COOH}$)、氢原子($-\text{H}$)和可变的取代基团($-\text{R}$)。其中,氨基相对于羧基在 α 位的称为 α -氨基酸。取代基团可以是氨基酸或其他物质,各种氨基酸的区别就在于取代基团的不同。除最简单的甘氨酸(R 基团为氢原子)外,其他氨基酸均为手性氨基酸,因此都有旋光

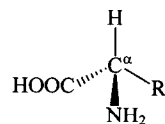


图 1.1 α -氨基酸的基本结构

性。按 Fisher 规则,所有组成蛋白质的天然氨基酸均为 L-型氨基酸;而按 Cahn-Ingold-Prelog 规则,除了半胱氨酸为 R-型氨基酸外,其余均为 S-型氨基酸。D-型氨基酸主要存在于一些微生物产生的抗生素和个别植物体内的生物碱中。

根据 R 基团的不同,氨基酸可分为碱性氨基酸(R 基团含有氨基)、酸性氨基酸(R 基团含有羧基)以及脂肪族氨基酸、芳香族氨基酸、含硫氨基酸、含羟氨基酸和亚氨基酸(图 1.2~图 1.8)。

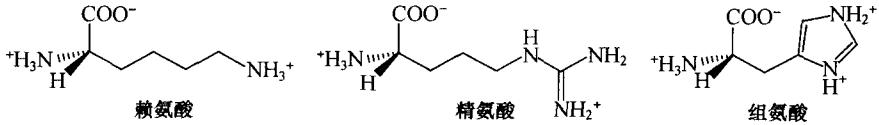


图 1.2 碱性氨基酸

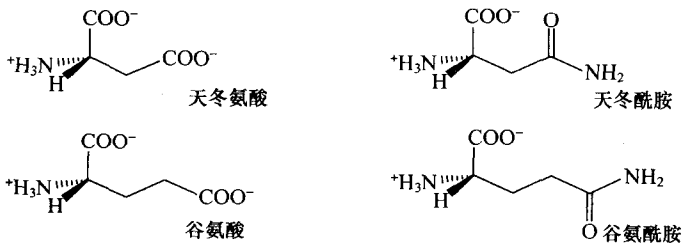


图 1.3 酸性氨基酸

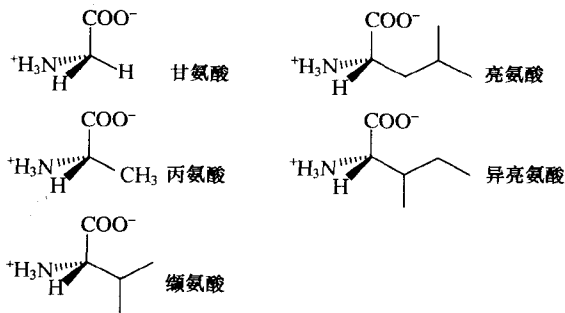


图 1.4 脂肪族氨基酸

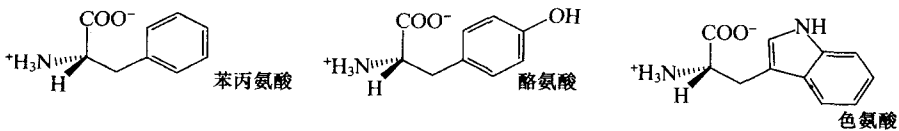


图 1.5 芳香族氨基酸

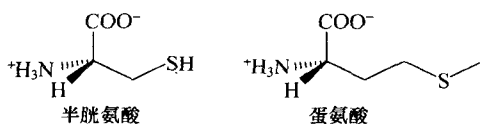


图 1.6 含硫氨基酸

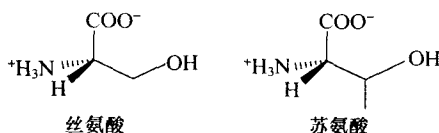


图 1.7 含羟氨基酸

氨基酸的命名通常用三字符或一字符表示。例如,精氨酸可用 Arg 或 R 表示,甘氨酸可用 Gly 或 G 表示。20 个天然氨基酸的简写式见表 1.1。这些天然氨基酸是构成肽链和蛋白质的基本单位。在组成蛋白质的氨基酸中,特殊氨基酸不超过 10%。

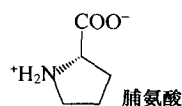


图 1.8 亚氨基酸

表 1.1 天然氨基酸的分类、命名、简写符与基本参数

分类及命名	三字 简写符	一字 简写符	相对分 子质量	含量/%	pK ₁ α-COOH	pK ₂ α-NH ₃ ⁺
碱性氨基酸						
赖氨酸(lysine)	Lys	K	146.2	5.9	2.16	9.06
组氨酸(histidine)	His	H	155.2	2.3	1.8	9.33
精氨酸(arginine)	Arg	R	174.2	5.1	1.82	8.99
酸性氨基酸						
天冬氨酸(aspartic acid)	Asp	D	133.1	5.3	1.99	9.90
谷氨酸(glutamic acid)	Glu	E	147.1	6.3	2.10	9.47
天冬酰胺(asparagine)	Asn	N	132.1	4.3	2.14	8.72
谷氨酰胺(glutamine)	Gln	Q	146.2	4.3	2.17	9.13
脂肪族氨基酸						
甘氨酸(glycine)	Gly	G	75.1	7.2	2.35	9.78
丙氨酸(alanine)	Ala	A	89.1	7.8	2.35	9.87
缬氨酸(valine)	Val	V	117.2	6.6	2.29	9.74
亮氨酸(leucine)	Leu	L	131.2	9.1	2.33	9.74
异亮氨酸(isoleucine)	Ile	I	131.2	5.3	2.32	9.76

续表

分类及命名	三字 简写符	一字 简写符	相对分 子质量	含量/%	pK ₁ α-COOH	pK ₂ α-NH ₃ ⁺
芳香族氨基酸						
苯丙氨酸(phenylalanine)	Phe	F	165.2	3.9	2.20	9.31
酪氨酸(tyrosine)	Tyr	Y	181.2	3.2	2.20	9.21
色氨酸(tryptophan)	Trp	W	204.2	1.4	2.46	9.41
含硫氨基酸						
半胱氨酸(cysteine)	Cys	C	121.2	1.9	1.92	10.70
蛋氨酸(methionine)	Met	M	149.2	2.2	2.31	9.28
含羟基氨基酸						
丝氨酸(serine)	Ser	S	105.1	6.8	2.19	9.21
苏氨酸(threonine)	Thr	T	119.1	5.9	2.09	9.10
亚氨基酸						
脯氨酸(proline)	Pro	P	115.1	5.2	1.95	10.64

根据氨基酸在生理 pH 范围(6~7)的极性和电荷可分为:①中性非极性氨基酸,包括丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、蛋氨酸和脯氨酸;②中性极性氨基酸,其取代基因含有极性基团,包括甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、酪氨酸、半胱氨酸、丝氨酸和苏氨酸;③带正电荷氨基酸,包括缬氨酸、组氨酸和精氨酸;④带负电荷氨基酸,包括天冬氨酸和谷氨酸。

由于氨基酸含酸性和碱性的功能基团,所以氨基酸是一种两性电解质。氨基酸羧基的 pK 值介于 1.8~2.5 间,氨基的 pK 值介于 8.7~10.7 间(表 1.1)。在生理条件(pH6~7)的环境下,氨基解离为-NH₃⁺,羧基解离为-COO⁻。因此在 pH6~7 的情况下,氨基酸为两性离子。pH 较低时,羧基结合质子成为-COOH,氨基酸带正电。pH 较高时,氨基去质子成为-NH₂,氨基酸带负电(见图 1.9)。R 基团所含的功能基团也可有不同的 pK 值(表 1.1)。

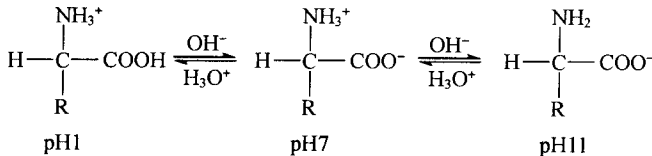


图 1.9 氨基酸的两性离子特性

每个氨基酸都有使其成为电中性的特定 pH,这个 pH 称为等电点(pI)。氨基酸处于等电点时,在电场环境中保持静止,不会向阳极或者阴极移动。等电点的值

可以通过 Henderson-Hasselbalch 方程计算：

$$pI = \frac{1}{2}(pK_i + pK_j) \quad (1.1)$$

式中, pK_i 和 pK_j 是参与电离的电离常数。该方程只适用于带有一个氨基和一个羧基的氨基酸, 其中 pK_i 和 pK_j 分别为氨基和羧基的 pK 值。如果氨基酸带有可电离的侧链, pI 值的计算将更加复杂。天然氨基酸的 pI 值见表 1.2。一些蛋白质的 pI 值见表 1.3。由于各个氨基酸 pI 值的不同, 使各氨基酸或蛋白质在电场中得以分离, 该技术称为等电聚焦, 将在以后章节中详细讲解。

表 1.2 天然氨基酸的 pI 值

中性非极性氨基酸	pI 值	中性极性氨基酸	pI 值	带电荷的氨基酸	pI 值
丙氨酸	6.02	甘氨酸	5.97	赖氨酸	9.74
缬氨酸	5.97	天冬酰胺	5.41	组氨酸	7.58
亮氨酸	5.98	谷氨酰胺	5.65	精氨酸	10.76
异亮氨酸	6.02	酪氨酸	5.65	天冬氨酸	2.87
苯丙氨酸	5.98	半胱氨酸	5.02	谷氨酸	3.22
色氨酸	5.88	丝氨酸	5.68		
蛋氨酸	5.75	苏氨酸	6.53		
脯氨酸	6.10				

表 1.3 某些蛋白质的 pI 值

蛋白质	pI 值	蛋白质	pI 值
胃蛋白酶	<1.0	马肌红蛋白	7.0
鸡卵清蛋白	4.6	人血红蛋白	7.1
人血清蛋白	4.0	牛核糖核酸酶 A	7.8
原肌球蛋白	5.1	马细胞色素 c	10.6
牛胰岛素	5.4	牛组蛋白	10.8
人纤维蛋白原	5.8	鸡溶菌酶	11.0
人 γ -球蛋白	6.6	鲑精蛋白	12.1
胶原蛋白	6.6		

1.1.2 肽与蛋白质

肽和蛋白质是由氨基酸通过肽键头-尾相连形成长链而组成的生物大分子。蛋白质的三维构象已经明确, 并在蛋白质的功能中发挥着不可替代的作用。蛋白质存在于所有形式的生命体中, 执行多种多样的任务。本章将对蛋白质的结构和功能进行简要介绍。