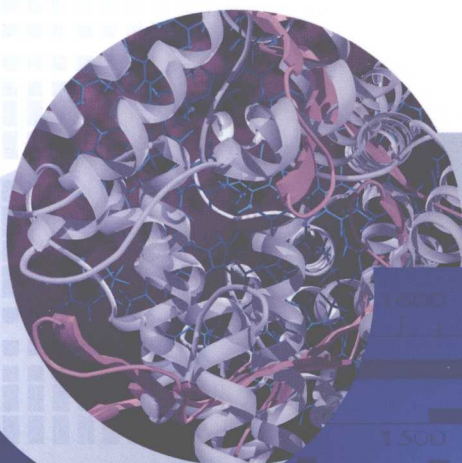


分析生物化学技术

曹成喜 主编

FENXI SHENGWU HUAXUE JISHU



化学工业出版社
生物·医药出版分社

分析生物化学技术

曹成喜 主编



化学工业出版社

生物·医药出版分社

· 北京 ·

本书主要包括绪论、电泳学基础与技术以及重要生物物质的分析三方面内容。在绪论中，主要介绍了分析生物化学的重要性、实验数据的统计处理与分析、检测质量的控制、样品保存和实验报告等基础问题。在电泳学基础与技术中，介绍了电泳学基础、凝胶电泳技术和毛细管电泳。重要生物物质的分析主要包括了PCR技术、核酸序列分析和蛋白质分析等。对于应用广泛的ELISA技术本书也作了介绍，详见酶联免疫吸附分析内容。

本书主要读者对象为传统的分析化学和药物分析等专业的科技工作者；生命科学（生物学、生物工程、生物技术和环境工程等专业）的科技工作者；以及医学检验和食品检验等专业的科技工作者。本书也可作为生命科学基地班（6年制）学生、相关专业的研究生和全国生物分析高级研修班等的教学用书。

图书在版编目 (CIP) 数据

分析生物化学技术/曹成喜主编. —北京: 化学工业出版社, 2008. 1

(生物化学基础与应用丛书)

ISBN 978-7-122-01723-9

I. 分… II. 曹… III. 分析化学: 生物化学 IV. Q5

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2007) 第 198412 号

责任编辑: 李 丽 余晓捷

文字编辑: 张春娥

责任校对: 洪雅姝

装帧设计: 关 飞

出版发行: 化学工业出版社 (北京市东城区青年湖南街 13 号 邮政编码 100011)
生物·医药出版分社

印 刷: 北京永鑫印刷有限责任公司

装 订: 三河市延风装订厂

787mm×1092mm 1/16 印张 14 字数 349 千字 2008 年 2 月北京第 1 版第 1 次印刷

购书咨询: 010-64518888 (传真: 010-64519686) 售后服务: 010-64518899

网 址: <http://www.cip.com.cn>

凡购买本书, 如有缺损质量问题, 本社销售中心负责调换。

定 价: 37.00 元

版权所有 违者必究

序言

一次次机会促成了《分析生物化学技术》的酝酿和撰写，并最终出版发行。记得2002年我初到上海交通大学工作，除开展“生物分离与生物分析实验室”的建设外，同时还承担了三门课程的教学工作，其中的一门课程便是面向生命科学和生物医学研究生（包括生命科学六年制的基地班同学）的《分析生物化学》。接手这门课后，感到难度很大。一方面是国内没有相关的教材，即使国外有《Analytical Biochemistry》，但相关教材明显不适合我国国情；另一方面是有关生命科学的研究生来自全国不同的高校，专业背景相差很大，要使这门课适合这些研究生确实存在很大的难度。

一次偶然的碰头会，我接触到化学工业出版社的编辑一行。经过讨论我们达成基本共识：有必要出版分析生物化学专业图书，这不仅可以满足我国研究生教育迅速发展的需要，而且可以满足相关的科技工作者对分析生物化学的需求。也就是在这次碰头会后不久，我们初步确定了这本书内容的基本框架：①在生命科学领域常用的四大谱学，包括紫外光谱、红外光谱、核磁共振谱（NMR）和生物质谱；②色谱技术，包括基础理论、简便易行的薄层色谱和常用的高效液相色谱（HPLC）；③电泳技术，包括电泳学基础、凝胶电泳和毛细管电泳；④重要生物物质的分析，包括PCR技术、核酸序列分析和蛋白质分析等；⑤应用广泛的ELISA技术。

四大光谱和色谱技术不仅涉及仪器分析基础，有其相对的独立性，而且在生命科学研究中非常重要；但有些生命科学研究工作者对这两部分内容并不熟悉。考虑到这些情况，编者将这两部分内容（包括相关的在生命科学中的应用）编著在《生物化学仪器分析基础》一书，其余内容放在本书，即《分析生物化学技术》中。这两本书几乎同时出版发行。需要了解仪器分析基础知识的读者可参考《生物化学仪器分析基础》。

一些单位和个人对本书的出版做出了重要贡献，借此机会我表达心中久存的谢意。感谢交通大学为本书的出版提供的机会和资助；感谢王慧君博士、陈龙博士、陈金联博士、张晓君博士，是他们的专业知识丰富了本书的内涵；感谢我的同事樊柳荫博士、李杉博士和宋明全老师，以及我的研究生秦维华、张薇、邵菁、骆新俊、陈愬、孟佳和陈茜等同学。

最后，要感谢本书的读者，尤其是将要提出宝贵意见的您。由于水平所限，本书难免存在不当之处，对于这些恳请读者及时指出。您的宝贵意见和批评对于我们再版时的修改和调整非常重要。

曹成喜

于上海交通大学 思源湖畔

2007年7月23日

目 录

第1章 绪论	1
1.1 分析生物化学的重要性	3
1.1.1 过程分析和监测	3
1.1.2 重大发现	4
1.1.3 生命科学研究	5
1.2 分析方法的选择	6
1.2.1 方法选择的基本原则	6
1.2.2 选择前应了解的信息	7
1.2.3 分析的一般步骤	8
1.2.4 仪器分析	8
1.2.5 生理学分析	9
1.2.6 诊断试剂盒检测	10
1.3 实验数据的变异及其处理	10
1.3.1 偶然误差	10
1.3.2 系统误差	12
1.4 方法可靠性的评估	14
1.4.1 精密度	14
1.4.2 准确度	17
1.4.3 专一性	21
1.4.4 灵敏度	22
1.4.5 定量限	22
1.4.6 线性范围	22
1.4.7 耐用性	23
1.5 质量管理和控制	23
1.5.1 Shewart 平均值质量控制法	24
1.5.2 Cusum 质量控制法	25
1.6 样品的保存与处理	26
1.7 实验结果处理和报告	27
1.7.1 实验原始记录和标签	27
1.7.2 计量单位的挑选	27
1.7.3 标准曲线	27
1.7.4 检测报告	28
参考文献	29
第2章 电泳学基础	30

2.1 移动界面系统	31
2.1.1 静止浓度界面	31
2.1.2 强电解质构成的 MBS	32
2.1.3 弱电解质形成的 MBS	34
2.1.4 MBS 在电泳中的应用	34
2.2 移动反应界面	39
2.2.1 强电解质形成的 MRB	39
2.2.2 弱电解质形成的 MRB	40
2.2.3 判别式	42
2.2.4 Deman-Rigole's 方程	43
2.2.5 静止反应界面	43
2.2.6 Pospichal 方程	44
2.2.7 应用	44
2.3 基本电泳模式	47
2.3.1 区带电泳	47
2.3.2 等速电泳	48
2.3.3 等电聚焦电泳	49
2.4 符号及其意义	50
参考文献	52
第3章 凝胶电泳	55
3.1 醋酸纤维素薄膜电泳	56
3.1.1 原理	56
3.1.2 方法	57
3.1.3 应用	58
3.2 聚丙烯酰胺凝胶电泳	59
3.2.1 原理	59
3.2.2 类型	59
3.2.3 条件选择	60
3.2.4 应用	61
3.3 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳	62
3.3.1 原理	62
3.3.2 方法	63
3.3.3 运行条件	67
3.3.4 电泳结果处理	67
3.3.5 应用	68
3.4 琼脂糖凝胶电泳	68
3.4.1 琼脂糖化学	68
3.4.2 核酸电泳	68
3.4.3 染色	69
3.4.4 免疫电泳	70

3.4.5 应用	70
3.5 等电聚焦电泳	71
3.5.1 原理	71
3.5.2 载体两性电解质	71
3.5.3 方法	73
3.5.4 条件选择	75
3.5.5 应用	76
3.6 双向电泳	77
3.6.1 概述	77
3.6.2 双向电泳原理	77
3.6.3 模式选择	77
3.6.4 应用	78
3.7 印迹技术	78
3.7.1 基本原理	78
3.7.2 DNA 印迹法	79
3.7.3 RNA 印迹法	79
3.7.4 蛋白质印迹法	80
3.8 新进展	81
3.8.1 脉冲场凝胶电泳	81
3.8.2 单细胞凝胶电泳	82
3.8.3 变性梯度凝胶电泳	82
参考文献	83
第4章 高效毛细管电泳	85
4.1 仪器	86
4.1.1 毛细管	87
4.1.2 高压电源	87
4.1.3 检测器	87
4.1.4 数据采集处理系统	89
4.1.5 柱恒温系统	89
4.2 电渗流	90
4.2.1 电渗流形成机理	90
4.2.2 电渗流的影响因素	90
4.3 电泳模式	91
4.3.1 毛细管区带电泳	91
4.3.2 毛细管等速电泳	91
4.3.3 毛细管等电聚焦电泳	92
4.3.4 胶束电动毛细管色谱	93
4.3.5 非水相毛细管电泳	93
4.3.6 毛细管凝胶电泳	94
4.4 进样方式	95

4.4.1	电动进样	95
4.4.2	压力进样	95
4.4.3	扩散进样	95
4.4.4	流动注射进样	96
4.5	分离条件选择	96
4.5.1	分离条件选择策略	96
4.5.2	无机离子	97
4.5.3	手性物质	97
4.5.4	蛋白质	98
4.5.5	核酸	99
4.6	应用	99
4.6.1	药物分析	99
4.6.2	环境分析	101
4.6.3	临床分析	102
4.6.4	蛋白质分析	103
4.6.5	核酸分析	104
4.6.6	多糖分析	104
4.7	新进展	105
4.7.1	阵列毛细管电泳	105
4.7.2	芯片毛细管电泳	106
	参考文献	106
第5章	PCR 技术	109
5.1	基本原理和方法	110
5.1.1	基本过程	110
5.1.2	反应体系的组成与反应条件	112
5.1.3	材料设备及试剂	113
5.1.4	操作步骤	114
5.1.5	模板的制备	114
5.1.6	PCR 扩增产物分析	117
5.1.7	PCR 产物的纯化	118
5.2	PCR 的引物设计	119
5.2.1	引物设计的基本原理	119
5.2.2	引物设计的基本原则	119
5.3	PCR 常见问题	122
5.3.1	假阳性及解决方案	122
5.3.2	PCR 污染的预防措施	123
5.3.3	假阴性及解决方案	124
5.4	常用基本操作方法及主要用途	125
5.4.1	反转录 PCR	125
5.4.2	多重 PCR	127

5.4.3	套式 PCR	128
5.4.4	不对称 PCR	128
5.4.5	反向 PCR	129
5.4.6	锚定 PCR	129
5.4.7	标记 PCR 和彩色 PCR	129
5.4.8	免疫 PCR	130
5.4.9	原位 PCR 技术	130
5.4.10	实时荧光定量 PCR	131
5.5	PCR 技术的应用	132
5.5.1	PCR 在生物学领域的应用	132
5.5.2	PCR 技术在医学检验中的应用	132
	参考文献	133
第 6 章	核酸序列分析	135
6.1	核酸的多态性分析	136
6.1.1	DNA 长度多态性分析	136
6.1.2	微卫星 DNA 分析	139
6.1.3	单核苷酸多态性分析	140
6.1.4	微生物群落核酸多态性分析	142
6.2	芯片杂交技术	145
6.2.1	基因芯片的种类与制作方法	146
6.2.2	样品与芯片的分子杂交	149
6.2.3	生物芯片的光学检测和数据处理	149
6.2.4	生物芯片应用	150
6.3	DNA 序列分析	152
6.3.1	传统的测序方法	152
6.3.2	新一代 454 测序法	156
6.3.3	DNA 测序技术的发展与展望	158
	参考文献	159
第 7 章	酶联免疫吸附分析	160
7.1	基础知识	161
7.1.1	抗原	161
7.1.2	抗体	161
7.1.3	抗原-抗体反应	162
7.1.4	标记免疫分析	164
7.1.5	酶免疫测定	164
7.2	原理与方法	164
7.2.1	基本原理	164
7.2.2	ELISA 方法	165
7.3	ELISA 仪器	168
7.4	ELISA 试剂	169

7.4.1	免疫吸附剂	169
7.4.2	结合物	172
7.4.3	底物	174
7.4.4	洗涤液	175
7.4.5	终止液	175
7.4.6	对照品	175
7.4.7	标准品	176
7.5	操作要领	176
7.5.1	样品的采集与保存	176
7.5.2	试剂的准备	177
7.5.3	加样	177
7.5.4	保温	177
7.5.5	洗涤	178
7.5.6	显色	178
7.5.7	比色	179
7.5.8	结果判断	179
7.6	应用	181
7.6.1	临床诊断	181
7.6.2	生命科学研究	182
7.6.3	预防医学	182
	参考文献	183

第8章	蛋白质分析	184
8.1	蛋白质化学	185
8.1.1	氨基酸	185
8.1.2	肽键	186
8.1.3	一般性质	186
8.1.4	蛋白质结构	187
8.2	蛋白质浓度测定	188
8.2.1	凯氏定氮法	188
8.2.2	紫外吸收法	189
8.2.3	Lowry法及其改进方法	191
8.2.4	考马斯亮蓝法	192
8.3	蛋白质纯度分析	192
8.3.1	纯度鉴定原则	192
8.3.2	常用纯度检测方法	193
8.4	分子量测定	194
8.4.1	SDS-PAGE法	194
8.4.2	凝胶过滤色谱法	194
8.4.3	生物质谱法	195
8.5	蛋白质等电点测定	195

8.5.1	凝胶等电聚焦电泳法	195
8.5.2	毛细管等电聚焦电泳法	196
8.5.3	聚焦色谱法	197
8.6	C端分析	197
8.6.1	羧肽酶法	197
8.6.2	肼解法	198
8.7	N端分析	198
8.7.1	FDNB法	199
8.7.2	DNS-Cl法	199
8.7.3	Edman降解法	200
8.8	肽谱分析	201
8.9	氨基酸组成分析	202
8.9.1	蛋白质水解	202
8.9.2	氨基酸衍生	203
8.9.3	氨基酸分离检测	205
8.10	蛋白质结构分析	206
8.10.1	一级结构分析	206
8.10.2	二级结构分析	207
8.10.3	三级结构分析	208
8.10.4	亚单位分析	209
8.10.5	二硫键分析	210
	参考文献	211
	附录	212

第1章 绪 论

- 1.1 分析生物化学的重要性
- 1.2 分析方法的选择
- 1.3 实验数据的变异及其处理
- 1.4 方法可靠性的评估
- 1.5 质量管理和控制
- 1.6 样品的保存与处理
- 1.7 实验结果处理和报告

什么是分析生物化学？在定义之前，先看以下实例。在医院作体检时，医生通常会检查我们的乙肝病毒的感染和肝功能等情况。当血液检查出现乙肝病毒表面抗原阳性[即 HbsAg(+)] 时，说明已感染乙肝病毒，并具有传染性。同时，如果谷丙转氨酶(GPT) 的活性为 460U/L 单位（正常值在 10~40U/L），说明有肝脏损害的表现。又如，我们在寻找具有药效作用的未知化学成分后，必须表征这种新成分的结构，包括未知成分的分子式、化学结构、甚至手性结构，同时还要测定药物在生物体内器官组织的分布、代谢以及代谢动力学等。所有这些均涉及到分析生物化学或药物分析等。从这些具体的例子中，我们能够初步体会什么是分析生物化学及其相关的应用等。首先了解以下相关名词解释。

分析生物化学 (analytical biochemistry) 指的是分析检测生物样品中所关注的物质是否存在、测定其中的成分含量、监测成分含量的变化、表征成分结构等所涉及的所有分析原理、方法、仪器设备和相关应用的学科。分析生物化学涉及范围非常广泛，如生物过程的监测和质量控制、基础医学研究、临床医学检验、生命科学研究、药物分析、食品分析和质量控制以及农林水产等。分析生物化学与传统分析化学和现代仪器分析息息相关，因分析生物化学的很多方法和技术直接借用于分析化学和现代仪器分析。但分析生物化学又有其自身的特点，如免疫学分析和组织化学分析等均有其特有的原理方法和应用等，而且不可替代；又如核酸碱基序列和蛋白质氨基酸序列的分析等。分析生物化学有定性、定量、半定量分析、结构分析和动态分析等，以下分别加以介绍。

定性分析 (qualitative analysis)：指分析样品中具体的物质组成是什么的研究形式。即分析生物样品中我们感兴趣的物质是否存在？是阳性还是阴性？如乙肝表面抗原 HbsAg 的血液学分析为定性分析，即 HbsAg 为阳性 (+) 或阴性 (-)。

定量分析 (quantitative analysis)：指分析样品中具体的物质含量是多少的研究形式。研究要求不仅分析生物样品中所关注的物质是否存在，而且还要测定其具体含量的多少。如血清谷丙转氨酶 (GPT) 的活性测定为 460U/L 为定量分析。定量分析非常重要，它不仅印证定性分析的结果，而且人们借助其可以使定性分析的结果上升为一种经得起验证的科学理论。

半定量分析 (semi-quantitative analysis)：相对定量分析而言半定量分析是将一定范围内的定量分析分成几个等级并依次表明相对含量的多少，是对定量分析的粗化；相反，相对定性分析而言，半定量分析是对定性分析的细化。例如在做糖尿病病人的尿液检查时，我们常看见如下检验报告：尿糖 (-)、(+) 和 (++)，这些分别对应尿液葡萄糖检测阴性、阳性和强阳性。

分子结构分析 (analysis of molecular structure)：利用各种手段和方法对未知物质的分子结构（包括分子的各个基团和所有原子）进行测定、拼接、分析和表征的整个过程。对生物分子进行结构分析（尤其是生物大分子）是一个高度复杂的过程，涉及多个学科和多种分析手段。目前，生物分子结构分析的主要手段有紫外-可见光谱、红外光谱、拉曼光谱、核磁共振谱、物质谱、X 射线衍射和旋光分析等。

动态分析 (dynamical analysis)：检测生物样品中某物质在不同时期含量的变化及其变化规律。如在发酵生产青霉素时，我们需要监测在不同发酵阶段的发酵液中青霉素含量的变化，结合其他因素确定最佳的发酵时间等。又如，在确定药物的使用方法和使用剂量前，必须要检测药物使用后药物的血浓度随时间的变化关系，根据这些变化规律确定药物的剂型、使用剂量和使用方法。

1.1 分析生物化学的重要性

分析生物化学的应用非常广泛，在众多领域具有不可替代的作用。以下结合生物化工过程、生物医药中的重大发现以及生命科学研究等来阐明分析生物化学的重要性。

1.1.1 过程分析和监测

过程分析和监测是分析化学（包括生化分析）面临最多的生产实践性问题。以白细胞介素（IL）或酶的工程菌发酵生产为例，其生物化工的过程由一系列单元操作过程组成，其目标产物往往是单一的 IL 或酶等，但目标产物的含量要受到很多物理化学参数的影响。因此，在生产过程中我们不仅要监测目标产物蛋白质的含量、酶活性和纯度（参见图 1.1）；而且还要监测多种化学成分及其变化，如培养阶段要测定 pH 值、渗透压、含氧量、各种无机盐离子、维生素、糖和其他蛋白质等。

在分离阶段不仅要分析目标产物的含量和回收率，同时还要分析其他杂质是否存在以及有哪些种类，从而指导下一步的分离单元操作。对于一种新的蛋白质或酶，我们还要进行免疫学分析、蛋白质的结构表征分析，包括蛋白质的常规分析等。图 1.1 所示为在分离纯化阶

纯度	A. 生物分离纯化阶段和方法	B. 生物分析阶段和方法
1. 初步纯化(1% 纯度)	发酵产物 细胞破碎提取(如在胞内) 蛋白质初步纯化 硫酸铵沉淀 有机试剂沉淀 膜分离 吸附纯化	蛋白质纯度分析 PAGE SDS-PAGE 密度梯度-PAGE HPLC HPCE 酶活性分析 酶活性测定 酶活性动力学
2. 部分纯化(纯度50%~90%)	电泳纯化 制备性电泳 等电聚焦电泳(IEF) 自由流式电泳(free flow fractionation) 色谱纯化 凝胶过滤 离子交换色谱 反相色谱 亲和色谱	蛋白质常规分析 浓度测定 IEF测定蛋白质pI 分子量测定 沉降系数 氨基酸组成分析 消光系数测定 免疫学分析 ELISA 免疫电泳 双扩沉淀实验 蛋白质印迹法
3. 高度纯化(纯度99%)	酶/蛋白质精制 制备性HPLC 亲和色谱 高分辨IEF 2-D凝胶电泳 蛋白质结晶	蛋白质结构分析 一级、二级、三级结构分析 亚单位分析 二硫键分析

图 1.1 分析生物化学在生物分离过程中的应用

段所涉及的蛋白质分析的一些方法和内容。这些内容将在有关蛋白质分析和表征中进一步加以介绍。

1.1.2 重大发现

新的分析原理和方法的建立是强有力的杠杆，这一杠杆撬动了又一个一个的关于生物医药的重大发现和新学科的建立。显微镜的发明导致细胞的发现和细胞学说的建立。电子显微镜和超速离心机的发明导致各种亚细胞结构“细胞器”的发现，超速离心的发明更使我们能够测定生物大分子的沉降系数和分子量等。以下两个具体实例更能说明分析生物新方法的建立对生物科学的重大发现和发展所起的关键作用。

例 1 X 射线衍射与蛋白质结构测定

蛋白质在生物体内占有特殊的地位，它与核酸（和多糖）一起构成了生命现象最主要的物质基础。蛋白质的结构通常有一级结构、二级结构、三级结构和四级结构。蛋白质的一级结构可用化学方法或基因序列的方法测定。1958 年英国化学家桑格（Sanger）就因用自己创立的 Sanger's 方法测定了牛胰胰岛素上的全部氨基酸序列从而荣获诺贝尔化学奖（详情请见第 8 章 蛋白质分析）。蛋白质的二级、三级和四级结构信息可以根据蛋白质的三维结构推测。蛋白质的功能是由其三维结构所决定的，因此测定蛋白质的三维结构并在此基础上研究其结构与功能的关系是现代生命科学重要的研究内容之一。以下介绍如何测定蛋白质的三维结构。

目前测定蛋白质三维结构的方法主要有两种，一种是蛋白质的核磁共振法，一般用于测定蛋白质在水溶液中的结构；另一种是 X 射线衍射法，主要用于测定蛋白质的晶体结构。因其局限性，核磁共振法至今只能测定分子量较小的蛋白质的结构。而 X 射线衍射法是其手段和方法不可比拟和替代的，时至今日它仍然是蛋白质的三维结构及其功能关系研究最主要的手段之一，但其创立和发展是一个漫长的过程。

在用 X 射线衍射技术研究蛋白质的三维结构方面，英国科学家伯纳尔是其中的先行者，他早在 20 世纪 30 年代就开始了这方面的研究。1934 年伯纳尔与年轻女科学家霍奇金获得了在母液中生长的胃蛋白酶晶体的 X 射线照片。这是人们首次获得的蛋白质晶体的 X 射线衍射照片。在此之前，有科学家曾用干的蛋白质晶体进行 X 射线衍射实验，但由于得到的 X 射线衍射太弱，当时的科学家们认为蛋白质可能没有确定的三级结构。

几乎同时，在英国剑桥大学卡文迪什实验室，以佩鲁茨和肯德鲁为首的科学家们全身心投入到蛋白质三维结构的研究中，经过将近 25 年的艰苦努力，终于在 1960 年建立了“同晶置换法”并测定了肌红蛋白和血红蛋白的三维结构，开创了蛋白质晶体学发展的新纪元，这在分子生物学发展史上是具有划时代意义的伟大发现。这项工作不仅首次揭示了生物大分子的立体结构，而且建立了一直沿用至今的生物大分子晶体结构分析的“同晶置换法”。1962 年佩鲁茨和肯德鲁荣获了诺贝尔化学奖。蛋白质结构的测定及其功能的研究使我们对很多生命现象的认识更加深刻，如配体与蛋白受体的结合、小分子药物与靶蛋白的结合、蛋白质与蛋白质之间的相互作用等。这种对蛋白质结构与功能的本质认识和应用又衍生出新的分离分析技术，如酶联免疫吸附分析（ELISA）、免疫电泳、亲和分离等。

例 2 电泳方法及其在生命科学中的重要地位

20 世纪 30 年代，Tiselius 发明了重要的移动界面电泳，并利用自己设计的电泳装置和 Svensson 设计的光折射检测系统对马血清中的蛋白质进行了分离和鉴定。此前，人们猜想血清中的球蛋白为均匀的物质，而 Tiselius 通过实验证明，血清具有十分复杂的组成。从

图 1.2 展示的结果可以看到四条不同的蛋白质区带，其中移动最快的对应白蛋白，另外三条分别为 α 球蛋白、 β 球蛋白和 γ 球蛋白。他从其他动物身上抽取血清进行电泳分析，得到了相似的分析结果。进一步分析表明，每一区带蛋白质都包含几种稍许不同的蛋白质，虽然这些蛋白质淌度很接近，但其化学性质却有所不同。对血清蛋白质开展的研究对生物医学具有重要意义，即首次证明血清蛋白质为不均一的混合物，成分很复杂，人们对它们的认识还刚刚开始，有待进行更深层次的研究。因此也引起了人们对血清蛋白质研究的极大热潮。同时，实验结果表明，Tiselius 发展的完善的电泳分离技术是一种合理的、有应用前景的分析技术。为了奖励 Tiselius 对电泳等分析的贡献，诺贝尔委员会授予了他 1948 年的诺贝尔化学奖。

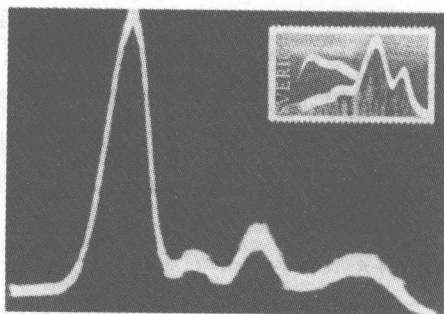


图 1.2 1937 年发表的第一张血清蛋白质电泳图谱及 1983 年 11 月 22 日发行的为纪念 5 位瑞典籍诺贝尔化学奖得主发行的 Philpot-Svensson 电泳图谱纪念邮票
引自：H. Rible (也就是 H. Svensson), *Electrophoresis*, 1984, 5: 1-17

此后，Tiselius 与他的学生等不断改进电泳实验方法，进而发展了滤纸电泳、醋酸纤维素薄膜电泳、琼脂电泳等。这些电泳技术设备简单、操作方便、分辨率高，并可用染色、紫外吸收、放射性和生物活性等方法分析待测物质，而且这些电泳技术作为生命科学的基础工具，目前仍被广泛使用。其后，Tiselius 的学生 Svensson (后改名 Rible, 见图 1.2) 于 1962 年建立了对蛋白质分辨率很高的等电聚焦电泳 (isoelectric focusing, IEF) 方法；Svensson 的合作伙伴 Vesterberg 于 1967 年发明了两性电解质载体 (carrier ampholyte)，这使得 IEF 进入了实质性的应用阶段。时至今日，IEF 以及由 IEF 组合而成的双向凝胶电泳 (2-D gel electrophoresis, 见第三、四章) 在蛋白质组学研究中发挥了极其关键的作用。而 Tiselius 的另一学生 Hjertén 于 1967 年发明了毛细管电泳，正是这一重要的发明为现代高效生化分析技术开辟了一条新的途径，并为人类基因组计划的提前完成做出了巨大贡献。

1.1.3 生命科学研究

分析生物化学在生命科学研究中起着极为关键的作用，以下的 3 个例子将从不同侧面说明其在生命科学研究中的重要地位和关键作用。

例 1 蛋白质的分析

在生命科学研究领域，分析生物化学应用广泛，已渗透到生命科学的各个分支。以蛋白质的分析为例 (图 1.1)，其纯度分析一般采用聚丙烯酰胺凝胶电泳 (polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE) 或 SDS-PAGE 或密度梯度-PAGE 等。如为未知蛋白质，还要进行蛋白质的表征分析，包括等电点、亚单位、肽图、氨基酸序列、氨基酸组成、二级结构、二硫键、X 射线衍射分析和光谱分析等。如果为酶，还要进行酶活性分析和酶反应动力学测定等。一般的蛋白质具有免疫原性，因此还要做进一步的免疫学分析，包括 ELISA、免疫电泳、双扩沉淀实验和蛋白质印迹法 (免疫印迹法) 等。

例 2 高效毛细管电泳与人类基因组的完成

人类基因组有 30 亿个碱基对 (bp)，按传统的 Sanger 的厚凝胶测序法，单个碱基对的检测费用高达 2~10 美元，整个人类基因组完成的总检测费用在 60 亿美元以上，需要 300 年时间完成 (表 1.1)。在 1996~1998 年间，由于检测方法的改进和提高，单个碱基对的检

测费用降低至 1 美元，总检测费用降低至 30 亿美元以下，完成时间减少到 15~30 年以内。然而，我们实际完成的时间是在 2002 年，比计划完成的时间提前十多年。那么，是什么分析技术使我们如此多快好省地完成了人类基因组的测序工作的呢？是毛细管凝胶电泳（技术），尤其是多道（96 道）毛细管凝胶电泳技术的应用。由于毛细管凝胶电泳的应用，单次运行的时间小于 1h，单个碱基对的检测费用降低至 0.1~0.2 美元（现在国内已下降到 0.2 元/bp 以内），总检测费用减少到 6 亿美元，年检测速度 5 亿碱基对以上，因此在不到五年的时间内完成了人类基因组剩余的检测任务。

表 1.1 不同电泳技术引进对人类基因组检测费用、检测速度和完成时间的影响

年份	方法	凝胶厚度/ μm	电压/ $\text{V}\cdot\text{cm}^{-1}$	时间/h	检测费/ $\text{美元}\cdot\text{bp}^{-1}$	总费用/ 亿美元	速度/ $\text{bp}\cdot\text{年}^{-1}$	完成时间/年
1990	厚凝胶电泳	400~600	30	8~10	2~10	>60	1000	300
1996	薄凝胶电泳	100~200	150	1.5~2	1~2	约 30	10000	30
1998	薄凝胶电泳	100	>150	<1.5	<1	<30	20000	15
2002	96 道毛细管电泳	50	>400	<1	0.1~0.2 ^①	<6	>50000	<5

① 现国内降低至 0.1 元/bp 以下。

从人类基因组实施和完成的情况不难看出“工欲善其事，必先利其器”的极端重要性。

例 3 分析类仪器在生物类实验室所占的比例

分析类仪器在生物类实验室中占有较高的比例，少则占实验室建设费用的 30%~40%，一般在 40%~60%，有的甚至更高，在 70% 以上。表 1.2 为某一系统生物学研究所实验室建设时，相关生物模型、分析仪器设备和信息处理平台等投入的经费以及所占比例。从中不难看出，在生物医药等生命科学的研究中，分离分析仪器在实验室建设中占有很高的比例。

表 1.2 某系统生物学实验室计划的建设费用分配和相关比例

经费与分配比例	实验动物和微生物模型	分析仪器设备	计算机和信息处理平台
经费分配/万元	1400	8600	2000
分配比例	12%	71%	17%

1.2 分析方法的选择

分析方法多种多样，有传统的化学分析，有现代的仪器分析，也有新型的免疫学和生物传感分析以及方便的诊断试剂盒等。如何从中选择出我们所需要的分析方法，这需要介绍一些方法选择的基本原则。

1.2.1 方法选择的基本原则

首先是分析方法的专一性和灵敏度是否达到实际要求。专一性和灵敏度是分析方法应用的前提，如果检测方法缺少专一性，则会出现严重的系统误差；如果灵敏度达不到实际要求，则开发的方法不能检测到某物质的存在，即使这种物质存在。

在选择分析方法时，还要考虑生化分析方法能否较好地满足实际检测通量的要求。但检测通量过高会带来设备的浪费。