

SEPU JISHU CONGSHU

色谱技术丛书

色谱在生命科学中的应用

廖杰 钱小红 董方霆 张养军 编著



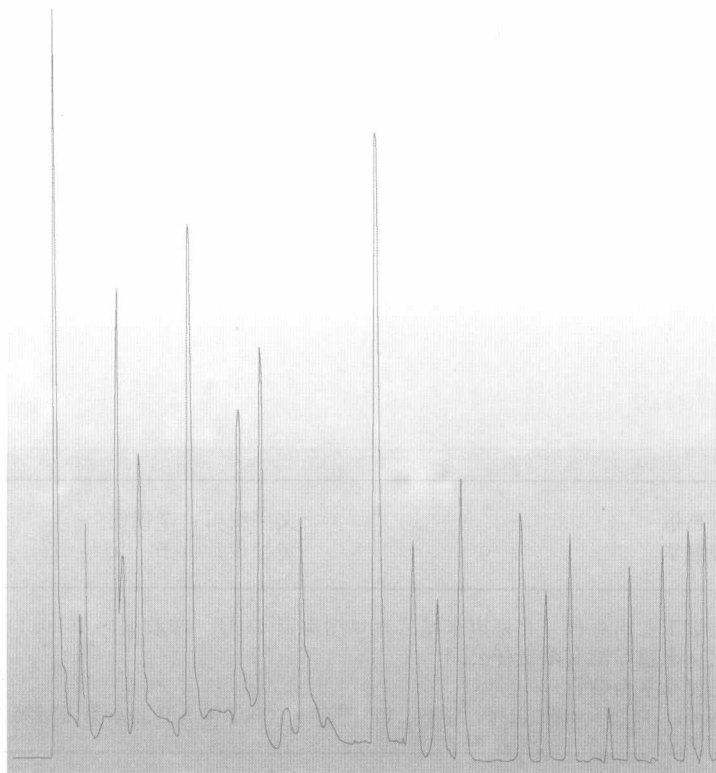
化学工业出版社

SEP U J I S H U C O N G S H U

色 谱 技 术 丛 书

色谱在生命科学中的应用

廖 杰 钱小红 董方霆 张养军 编著



化学工业出版社

· 北京 ·

图书在版编目 (CIP) 数据

色谱在生命科学中的应用/廖杰等编著. —北京: 化学工业出版社, 2007. 7

(色谱技术丛书)

ISBN 978-7-122-00721-6

I. 色… II. 廖… III. 色谱法-应用-生命科学 IV. Q1-0

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2007) 第 101211 号

责任编辑: 任惠敏
责任校对: 陶燕华

文字编辑: 李锦侠
装帧设计: 于 兵

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)

印 刷: 北京永鑫印刷有限责任公司

装 订: 三河市宇新装订厂

720mm×1000mm 1/16 印张 13½ 字数 246 千字 2007 年 9 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: 29.00 元

版权所有 违者必究

色谱技术丛书（第二版）

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			
《色谱定性定量》	汪正范			
《气相色谱检测方法》	吴烈钧			
《液相色谱检测方法》	云自厚	欧阳津	张晓彤	
《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	丁晓静	
《毛细管电泳技术及应用》	陈义			
《色谱分析样品处理》	王立	汪正范		
《色谱联用技术》	汪正范	杨树民	吴侔天	岳卫华
《色谱柱技术》	刘国詮	余兆楼		
《色谱仪器维护与故障排除》	吴方迪			
《制备色谱技术及应用》	袁黎明			
《亲和色谱方法及应用》	于世林			
《裂解气相色谱方法及应用》	金熹高			
《色谱手性分离技术及应用》	邓玉林			
《气相色谱在石油化工中的应用》	杨海鹰			
《色谱在环境分析中的应用》	江桂斌	牟世芬		
《色谱在食品安全分析中的应用》	王绪卿	吴永宁		
《色谱在生命科学中的应用》	廖杰	钱小红		
《色谱在药物分析中的应用》	田颂九			
《色谱在无机材料分析中的应用》	胡净宇			

内 容 提 要

本书为色谱技术丛书中的一册，全书共有五章，简要介绍了目前在生命科学研究中常用的色谱技术，详细讨论了这些技术在脱氧核糖核酸分析、生物技术药物的纯化鉴定、生物标志物检测，以及蛋白质组研究中的应用。

书中以较大的篇幅列举了各种应用实例，便于读者在实际工作中参考。

本书可供基础医学，临床化学和生物制药领域的研究人员、技术人员参考使用。

序

《色谱技术丛书》第一版是从2000年初开始出版的。由于这是一套较全面地介绍当代色谱技术的丛书，取材新颖，内容丰富，所以从一出版就受到了读者的普遍欢迎和肯定，同时也被众多的技术培训班选作教材，致使每一分册的发行量都突破了万册。但是，随着科学技术的突飞猛进和国家经济建设的快速发展，色谱作为主要的分离分析技术，需求与应用越来越广泛，从事色谱分析工作的人员也越来越多，年轻的和刚刚从事色谱分析的人员急需普及和提高色谱分析的理论和技术。再者，色谱技术本身也在不断的发展，新技术不断出现，有必要向广大读者尽早介绍这些知识。此次，化学工业出版社与丛书主编、作者合作，适时地将这套丛书重新修订，再版面世，是对普及并推动色谱技术发展的又一贡献。

在经历了近五个年头的实践检验后，这套丛书的第二版除了对第一版原有的13个分册分别进行了修改和充实，增加了新的内容，包括新近发展的仪器、技术、方法与应用等的介绍，提高了丛书的质量；同时还进一步完善了整个丛书体系，增加了一些新的书目，特别是有关应用的书目，形成一套更完整的色谱技术丛书，以进一步满足广大读者的需求。增加的10本新的书目为：邓玉林等的《色谱手性分离技术及应用》，江桂斌、牟世芬等的《色谱在环境分析中的应用》，金熹高的《裂解气相色谱方法及应用》，廖杰、钱小红等的《色谱在生命科学中的应用》，田颂九等的《色谱在药物分析中的应用》，王绪卿、吴永宁等的《色谱在食品安全分析中的应用》，杨海鹰的《气相色谱在石油化工中的应用》，袁黎明的《制备色谱技术及应用》，于世林的《亲和色谱方法及应用》及胡净宇的《色谱在无机材料分析中的应用》。同第一版一样，这些分册的作者也都是长期在各自工作中

具有丰富经验的色谱专家。还应提出的是，此书也再次得到安捷伦科技有限公司的热情赞助。相信第二版《色谱技术丛书》会同第一版一样受到读者们的欢迎，特再为此序。

周同惠

2004年10月22日

第一版序

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。为此化学工业出版社提议，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

生命科学是研究各种生命现象的本质、发生和发展的规律,以及各种生物之间、生物与环境之间相互关系的科学。近年来,生命科学研究取得了重大进展,并以其发展促进了农业、医学和其他相关领域的进步,而色谱作为一种不可缺少的工具和手段,在其发展过程中,发挥了至关重要的作用。遵照丛书主编傅若农教授的要求,我们对色谱在这一领域中的部分应用进行了综述,希望能为从事基础医学、临床化学和生物制药工作的研究人员和技术人员提供参考。

本书首先简要介绍了生命科学研究中常用的色谱技术,然后分别讨论了这些技术在脱氧核糖核酸分析、生物技术药物纯化与鉴定、生物标志物检测和蛋白质研究中的应用。全书共五章,由廖杰和钱小红统编,其中第一、三章由董方霆编写;第二章根据田惠君博士(DNA的电泳分析)和李鸿彪博士(DHPLC的原理及应用)提供的资料由廖杰编写;第四章由廖杰编写;第五章由张养军编写。

尽管本书名为《色谱在生命科学中的应用》,但由于篇幅和学识所限,在书中我们只选择了这一广阔领域中的几个方面加以论述,尚未论及的其他领域和研究范围同样非常重要,希望将来有机会能得到补充和完善。

在本书即将出版之际,衷心感谢在编写过程中,丛书主编傅若农教授、副主编刘虎威教授所给予的指导和帮助,感谢田惠君博士、李鸿彪博士提供DNA分析方面的详尽资料,感谢刘国詮教授在百忙之中对书稿进行审阅。

由于编者的水平和时间所限,书中一定会有不少疏漏,衷心希望广大读者予以批评指正。

编 者
2007年6月

目 录

第一章 概述	1
第一节 液相色谱及其联用技术	1
一、液相色谱技术	1
二、联用技术	4
第二节 气相色谱及其联用技术	5
一、色谱柱	6
二、检测器	6
三、选择气相色谱分离条件的一般原则	6
四、气相色谱联用技术	7
参考文献	8
第二章 脱氧核糖核酸 (DNA) 的电泳与色谱分析	10
第一节 DNA 的提取和 PCR 扩增	10
一、概述	10
二、DNA 提取	11
三、基因突变的检测	12
第二节 DNA 的液相色谱分析	17
一、DNA 的变性高效液相色谱分析	17
二、应用实例	23
第三节 DNA 的电泳分析	28
一、DNA 的电泳分析	28
二、应用实例	33
参考文献	39
第三章 生物技术药物的纯化及鉴定	46
第一节 生物技术药物的分离纯化	46
一、蛋白质药物的纯化	46
二、核酸及寡核苷酸药物的纯化	54
第二节 蛋白质性质的鉴定	58
一、纯度鉴定	58
二、含量测定	65
三、氨基酸组成分析	65

四、N-末端序列分析	71
五、C-末端序列分析	78
六、等电点测定	80
七、肽指纹图谱	81
第三节 核酸的性质鉴定	83
一、核酸中碱基的分析	84
二、LC-MS 分析寡核苷酸的纯度	86
三、离子对反相色谱分析寡核苷酸阶梯序列	87
第四节 糖类生物药物分析	88
一、糖类药物的分析	89
二、多糖中单糖组成分析	91
三、糖类分析中的气相色谱及其衍生化技术	96
四、糖蛋白中糖的组成分析	99
参考文献	103
第四章 生物标志物的色谱分析	108
第一节 样品的采集和预处理	108
一、样品的采集和保存	108
二、生物样品的一般预处理方法	111
三、待测组分的提取	113
四、几种常用的样品处理技术	116
第二节 体内氨基酸的测定	118
一、体液氨基酸谱的 HPLC 分析	118
二、LC-MS/MS 用于新生儿氨基酸代谢紊乱的筛查	119
三、同型半胱氨酸的 HPLC 测定	121
四、3-甲基组氨酸的测定	123
第三节 体液中儿茶酚胺的测定	124
一、体液中儿茶酚胺的分析及样品处理	124
二、应用实例	125
第四节 体内天然甾体化合物的测定	130
一、天然甾体化合物及其测定方法	130
二、应用实例	132
参考文献	137
第五章 色谱在蛋白质组学研究中的应用	140
第一节 前沿	140
第二节 生物样品的处理方法	142
一、匀浆破碎	142
二、固体研磨破碎法	143

三、超声破碎法·····	144
四、蛋白质清洗和提取·····	144
第三节 色谱方法在蛋白质预分离和鉴定中的应用 ·····	145
一、色谱方法的预分离·····	145
二、液-质联用方法对整体蛋白质直接分析 ·····	148
三、液-质联用技术在整体蛋白质直接分析中的应用 ·····	150
四、色谱预分离与液-质联用技术在复杂蛋白质混合物分析中的应用 ·····	154
第四节 色谱方法在多肽分离和鉴定中的应用 ·····	160
一、一维液-质联用对简单肽混合物的分离鉴定 ·····	160
二、二维液-质联用对复杂多肽混合物的分离鉴定·····	162
三、液-质联用方法用于严重急性呼吸系统综合征冠状病毒结构蛋白 质的分析鉴定 ·····	163
第五节 色谱方法在翻译后修饰蛋白质组研究中的应用 ·····	169
一、色谱在磷酸化修饰蛋白质组研究中的应用 ·····	169
二、IMAC 亲和提取结合生物质谱用于磷酸化修饰蛋白质的分析鉴定 ·····	171
三、色谱方法在糖基化修饰蛋白质和多肽研究中的应用 ·····	182
四、凝集素亲和色谱-毛细管液相色谱-质谱联用于 N-糖基化修饰蛋白质及修 饰位点分析 ·····	186
第六节 色谱方法在定量蛋白质组研究中的应用简介 ·····	190
参考文献 ·····	193
符号表 ·····	198

第一章 概述

第一节 液相色谱及其联用技术

一、液相色谱技术

1903年,俄国植物学家茨维特创立了液相色谱^[1]。他在研究植物叶的色素成分时,将植物叶子的萃取物倒入填有碳酸钙的直立玻璃管内,然后加入石油醚使其自由流下,结果色素中各组分互相分离形成各种不同颜色的谱带。这种方法因此得名为色谱法。人们把这一方法叫做液-固色谱法。在这一方法中把玻璃管叫做“色谱柱”,碳酸钙叫做“固定相”,纯净的石油醚叫做“流动相”。尽管以后此法逐渐应用于无色物质的分离,“色谱”二字虽已失去原来的含义,但仍被人们沿用至今。

尽管色谱技术始于液相色谱,但在相当长的时间里液相色谱的发展非常缓慢。在20世纪40年代到50年代初,英国的生物化学家马丁等在研究生物体重要组成脂肪酸和脂肪胺时开创了以气体作流动相以液体作固定相的气-液色谱法,因而获得了1952年的诺贝尔化学奖。到20世纪60年代以后,随着使用方便的紫外检测器的发明和微粒形硅胶的出现,液相色谱尤其是高效液相色谱才得以飞速发展,并成为分离、分析的利器。从色谱出现的百年历史说明,色谱仪是揭开生命奥秘的有力工具,是应用最为广泛和应用十分成功的仪器,在生命科学领域有极大的应用前景^[2,3]。

高效液相色谱不受样品挥发度和热稳定性的限制,非常适合于分子量较大、难气化、不易挥发或对热敏感的离子型化合物、高聚物等的分离及分析。这些物质大约占有有机化合物总数的70%~80%^[4]。

高效液相色谱具有高效、快速和灵敏的特点,其分析复杂化合物的能力是其他色谱方法所不能比拟的,并且不受沸点、极性、热稳定性等因素的影响,因此应用十分广泛,尤其在生物医药领域中的应用具有很大的潜力。

液相色谱仪主要分为分析型、制备型和专用型等不同类型。虽然各类仪器型号很多,性能差异很大,应用范围也不尽相同,但基本组成部件是类似的。液相色谱系统主要由输液系统、进样系统、柱系统、检测和记录系统等部分组成,其

中对样品分离最重要的是色谱柱、输液泵和检测器三大部件。

液相色谱是根据溶质在不同介质间的分配的差异而得到分离的。可分为四种基本类型：液液色谱、液固色谱、离子交换色谱和排阻色谱。当样品各组分随流动相进入色谱柱后，随流动相沿着色谱柱扩散分布，使之在固定相和流动相之间分配平衡，在两相之间产生浓度差和差速迁移，从而达到分离目的。差速迁移与柱温、柱压、固定相和流动相的性质有关^[2~6]。下面简要介绍几种主要的分离模式。

1. 反相液相色谱

反相色谱 (reverse phase chromatography) 是液相色谱中应用最广泛的一种模式，通过溶质疏水性的不同而实现分离，属于一种液-液分配色谱^[7,8]。常用的反相填料中，键合烷基有 $C_1 \sim C_{18}$ 、苄基、苯基等。一般说来，填料的疏水性作用随链的增长而增加，同时流动相中有机成分的比例也必须随之增加。但由于基团体积随链长的增长而增大，使填料有效孔径变小，引起柱效降低。常用的流动相有甲醇、乙腈、异丙醇和二氧六环等。甲醇的洗脱强度最弱，二氧六环的洗脱强度最强，对难洗脱的物质可选用洗脱强度较大的溶剂实现快速分离。在选用混合流动相时，需考虑溶剂的黏度、介电常数、表面张力等^[9,10]。

2. 正相液相色谱

正相液相色谱 (normal phase chromatography) 是一种固定相为极性吸附剂 (或极性键合相)、流动相为非极性溶剂或弱极性溶剂的色谱法，也称液-固色谱法。其分离过程是由吸附剂、溶质和溶剂之间的相互作用决定的，这种作用表现在溶质分子和溶剂分子竞争吸附表面活性中心，同时也表现在溶质分子中不同官能团对吸附剂表面的竞争^[11]。正相色谱选择性分离的基础是吸附能力和解吸附能力的差异，溶剂在填料上的吸附作用越强，则溶质对吸附剂的作用越弱， k' 越小，保留越弱。反之，溶剂在填料上的吸附作用越弱，则溶质对吸附剂的作用越强， k' 越大，保留越强。溶质分子与吸附剂作用的强弱是由官能团结构决定的，有官能团差别的分子可以在液-固色谱上得到很好的分离。这种方法常用于医药领域以及各种有机酸及生物碱的分析。

正相色谱中常用的填料有硅胶、氧化铝和正相键合填料；常选用的流动相是极性较弱的有机相，如正己烷、四氯化碳、乙酸乙酯等。

3. 凝胶色谱

凝胶色谱 (gel chromatography) 又称排阻色谱或分子筛色谱，是根据化合物分子大小和形状的差别实现分离的一种技术。根据流动相的不同可分为凝胶渗透色谱和凝胶过滤色谱，前者使用有机溶剂作为流动相，后者使用水为流动相。一般说来，适合于相对分子质量大于 2000 的化合物。

凝胶色谱的分离是根据分子大小和形状的差别实现分离的。大分子不易进入填料的小孔中, 优先被洗脱下来; 小分子容易进入填料的小孔中, 滞留时间长, 因此分子根据由大到小的顺序洗脱。凝胶色谱可应用于分离蛋白质、脱盐或置换缓冲液^[4,5]。

4. 疏水作用色谱

疏水作用色谱 (hydrophobic interaction chromatography) 是活性蛋白质分离纯化中常常用到的一种分离手段, 它利用适当的疏水性填料, 以盐的水溶液作流动相, 根据疏水作用强弱分离蛋白质。疏水作用色谱的填料表面的疏水性较反相填料弱, 配基密度较反相低, 流动相中不含有有机溶剂, 因此在活性蛋白质分离的过程中蛋白质不会发生变性, 这是蛋白纯化过程中的优势^[12]。

5. 离子交换色谱

离子交换色谱法 (ion-exchange chromatography) 可普遍应用于核酸、蛋白质、氨基酸和糖类的分离分析中^[4,12,13]。在离子交换色谱中, 样品离子和离子交换剂上带固定电荷的活性交换基团之间发生离子交换, 不同的样品离子与离子交换剂的相互作用力不同, 作用弱的溶质不易被保留, 先从柱上被洗脱下来; 而作用强的则保留时间较长, 较晚从色谱柱上被洗脱下来。典型的离子交换剂可分为两类: 阳离子交换剂和阴离子交换剂。阳离子交换树脂中含有酸性基团 (如磺酸、羧酸等), 在交换集团 pK_a 以上带负电; 阴离子交换树脂中含有碱性基团 (如季铵、叔胺、仲胺), 在交换集团 pK_a 以下带正电。大部分离子交换色谱是在水溶液中进行的, 可根据样品和所选择的离子交换剂, 选择合适的流动相。流动相中缓冲液种类、溶剂强度、pH 值和有机溶剂的含量都会直接影响到样品的分离。

6. 离子对液相色谱

离子对色谱法 (ion-pair liquid chromatography, IP-HPLC) 是分离可离解化合物的一种分析方法, 又称萃取色谱。Schill 及其同事们对该方法进行了深入广泛的研究并发展了这一技术。它可用于分析水溶性的有机酸、有机碱、生物大分子及无机阴离子和阳离子。对离子的性质、浓度、流动相的种类、pH 值以及温度等都会影响反相离子对的分离, 并且各种对离子对保留值的影响也是不同的 (见表 1-1)。

7. 亲和色谱

亲和色谱是利用生物大分子之间的亲和力进行分离、纯化的液相色谱技术^[15]。它是通过生物分子间的相互作用 (包括: 酶与底物, 酶与抑制剂, 维生素与结合蛋白, 抗体与抗原等作用), 形成可逆的络合物进行分离, 并通过这种可逆作用, 将结合在柱上的生物分子洗脱下来。这种方法可用于分离抗体、结合蛋白、酶等具有特殊结合性能的生物活性物质^[16~18]。

表 1-1 影响反相离子对色谱分离的因素^[14]

改变因素	影响作用
对离子类型	生成离子对的能力越强,保留时间越长
对离子大小	对离子大小增加,保留时间增加
对离子浓度	对离子浓度增加,保留值有一定增加
pH 值	与样品特性有关,如样品离子化程度 pH 增加,则保留值增加
有机改性剂类型	随流动相疏水性的增加,保留值减小
有机改性剂浓度	随有机改性剂比例的增加,保留值减小
温度	温度增加,保留值减小
固定相	键合固定相表面覆盖率加大,疏水性增大,保留值增大

二、联用技术

1. 液相色谱-质谱联用技术 (LC-MS)

科学技术的发展,使得液相色谱的检测技术得到进一步的发展,不断有新的联用技术得到应用。生物医学的发展,也不断要求高灵敏度和高选择性的方法对研究的对象进行定性或定量研究。

液-质联用技术就是高分离度的液相色谱和高灵敏度及专一性的质谱的有机结合。色谱分离和质谱检测技术的进步将有力地推动生化分析的进展。LC 和 MS 的联用,使得液相色谱可以获得比紫外检测更多的信息。LC 优越的分离能力,可以将复杂体系中的物质进行分离,流出的组分分别被送入质谱检测器进行检测。质谱可以通过质荷比求得分子量,从而获得分子结构的信息。LC-MS 的出现,使得色谱分离出的组分不需要收集,浓缩,就可以直接分析,大大缩短了分析的时间。目前先进的质谱仪,还同时具备了分析分子结构的能力,即通过应用母离子扫描、子离子扫描、中性丢失等先进技术,对待测样品的结构进行分析判定^[19,20]。

在应用液-质联用技术分析生物大分子时,多使用软电离技术。20 世纪 80 年代以后,生物分子分析中使用最多的是电喷雾离子化技术 (ESI)。这项技术的发明,使得 John Fenn 教授获得 2002 年的诺贝尔化学奖。电喷雾离子源后面连接上串联质谱,可以直接检测离子碎片的质荷比,获得结构信息。串联质谱技术作为分析混合物和分子结构鉴定的重要手段,很早以前已得到应用。在串联质谱仪中,前级质谱主要用于担任分离工作,在样品被电离后,它只允许被分析的目标化合物的母离子通过,经过碰撞裂解后,由第二级质谱分析裂解后产生的碎片离子。目前,该技术已在医药、环境分析、食品分析、生物分析等方面得到了广泛应用,它不仅适用于复杂基体混合物的定性分析,而且可以利用二级质谱得到的结果进行定量分析^[21~24]。

2. 液相色谱-核磁共振波谱联用技术 (LC-NMR)