

SEPU JISHU CONGSHU

色谱技术丛书

毛细管电泳技术及应用

第二版

陈 义 编著



化学工业出版社
化学与应用化学出版中心

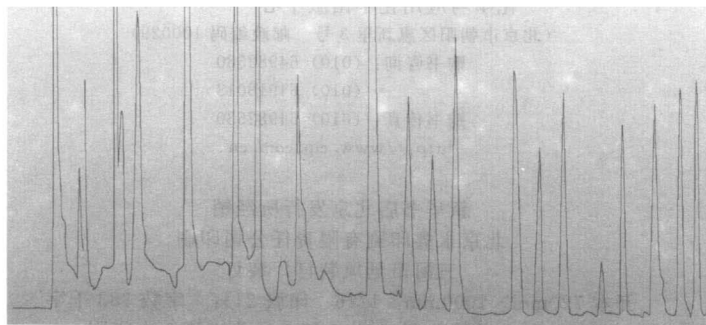
SEPUPU JISHU CONGSHU

色谱技术丛书

毛细管电泳技术及应用

第二版

陈 义 编著



化学工业出版社

化学与应用化学出版中心

· 北京 ·

图书在版编目 (CIP) 数据

毛细管电泳技术及应用 (第 2 版)/陈义编著. —北京: 化学工业出版社, 2005. 11

(色谱技术丛书)

ISBN 7-5025-7927-3

I. 毛… II. 陈… III. 毛细管-电泳-分析 (化学)
IV. O657. 8

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2005) 第 139684 号

色谱技术丛书

毛细管电泳技术及应用

第二版

陈义 编著

责任编辑: 任惠敏

文字编辑: 刘志茹

责任校对: 李林

封面设计: 于兵

*

化学工业出版社 出版发行
化学与应用化学出版中心

(北京市朝阳区惠新里 3 号 邮政编码 100029)

购书咨询: (010) 64982530

(010) 64918013

购书传真: (010) 64982630

<http://www.cip.com.cn>

*

新华书店北京发行所经销

北京永鑫印刷有限责任公司印刷

三河市延风装订厂装订

开本 720mm×1000mm 1/16 印张 21 $\frac{1}{2}$ 字数 383 千字

2006 年 3 月第 2 版 2006 年 3 月北京第 3 次印刷

ISBN 7-5025-7927-3

定 价: 39.00 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

重新出版一个关于毛细管电泳方法的册子，有很多原因，其中主要的是想改正一些错误，比如第三章公式(3-4)，在前一版的两次印刷中一直不太正确，希望不再流传下去。

在修改第一版原稿的过程中，发现有些章节不够充实，所以又补充了一点，比如关于电导检测、关于管壁处理、关于手性异构体分离、关于蛋白分离、关于DNA测序、关于细胞分析等。

看看改完，忽又觉得缺了几个重要内容：一是关于多维分离和阵列电泳，其惊人的通量，大大拉了人类基因组研究计划一把，而且还会再拉一把蛋白质组学研究也说不定，忘之不得；二是毛细管电泳与质谱等各种鉴定技术的联用，这可是个有用而又问题甚多的方法，玩其不易，弃之可惜；三是芯片电泳，或称微全分析系统(μ -TAS)，或曰微流控系统，其中隐含有先进的思想，很值得玩味，不可不介绍。

可是，要把它们纳入第一版的框架内，还真不容易。几经思量，最后决定将一、二两部分合并，归为一章，称之为“联用技术”，而将芯片电泳独立成章。为了使全书看起来还不至于太离谱，便把这两章插入到第一版的第六章与第七章之间，分别成为第七、八章，而原来的第七至第十一章，顺延成第九至第十三章。如此一来，在新版里，第一至第八章就主要是处理方法学问题了，其后各章则为应用。希望这种安排不会给看过第一版的读者带来不便。

还是那句老话，感谢国家自然科学基金委员会(No. 20435030、20420130137、20375042、20175030、29825112)、国家科技部(2002CB713803)和中国科学院(KJ CX2-SW-H06、KJ 951 A1-507、JQ-5-01、BH-28)对书中所涉及项目的经费支持。还要特别感谢唐家族基金会美国加州大学伯克立分部的资助，使作者有机会到美国走一遭。书中大部分的新资料，除了本实验室的工作之外，都是访美期间收集的。感谢戴东升博士帮助查阅核实第七章中的部分文献。特别感谢任惠敏老师认真细致和不辞劳苦地编辑工作。

最后要说的，就是敬请读者批评或来函指正，作者谨此预致谢忱！

陈义

2005年8月15日

目 录

第一章 绪论	1
第一节 概述	1
一、历史回顾	1
二、发展动向	2
第二节 电泳与色谱	3
第三节 毛细管电泳分离模式	4
第四节 毛细管电泳的特点	5
参考文献	7
第二章 毛细管电泳的基本理论	9
第一节 分离过程	9
一、分离的一般过程	9
二、差速分离过程	9
三、数学描述	10
第二节 基础概念	12
一、电泳、淌度、绝对淌度与有效淌度	13
二、电渗、电渗率及合淌度	14
三、两相分配与权均淌度	16
四、分离模式理论归属	16
第三节 分析窗口	17
第四节 理论效率及其表示	18
一、效率方程	18
二、峰加宽因素	18
参考文献	21
第三章 毛细管电泳仪器系统	22
第一节 毛细管电泳仪基本结构	22
第二节 进样系统	23
一、基本构成	23
二、进样方法	24
三、进样误差	26
第三节 毛细管清洗和缓冲液填灌机构	26
第四节 电源及电流回路	27
一、电源	27

二、电极与电极槽	27
三、导线	27
四、缓冲液	27
第五节 毛细管及其温度控制	28
一、检测窗口制作	28
二、温度控制	28
第六节 检测及其数据记录与处理系统	29
一、检测	29
二、数据记录与处理	37
参考文献	38
第四章 分离条件选择策略	40
第一节 毛细管电泳模式的选定	40
第二节 基本操作条件选择	41
一、电泳电压	41
二、电泳温度	42
三、毛细管及其洗涤	42
四、进样与聚焦进样	43
五、检测条件	46
第三节 分离介质选择	47
一、CZE 介质选择	47
二、CGE 与 NGCE 介质选择	50
三、MEKC 介质选择	52
四、其他模式的介质选择	54
第四节 条件选择流程	56
参考文献	56
第五章 毛细管制作技术	58
第一节 涂层技术	58
一、动态吸着技术	59
二、物理涂布技术	59
三、化学涂布技术	60
四、溶胶-凝胶技术	67
五、吸附-化学交联	68
第二节 凝胶毛细管制备	68
一、基本问题	68
二、解决策略	69
三、琼脂糖凝胶毛细管制备	69
四、聚丙烯酰胺凝胶毛细管制备	69

五、梯度聚丙烯酰胺凝胶毛细管制备	74
第三节 电色谱毛细管柱制备	76
一、填充柱的制备	76
二、整体柱的制备	78
第四节 特殊技术	81
一、扁塑料毛细管制作	81
二、毛细管吹泡/弯折	82
三、化学刻泡	82
四、毛细管拼接	82
参考文献	83
第六章 电渗控制	85
第一节 理论控制方法	85
第二节 实用控制方法	86
一、添加剂法	86
二、管壁涂层法	90
第三节 外加电磁场控制法	91
一、电场控制装置	91
二、电渗的单电源四电极控制	94
第四节 电渗电场控制的理论与结论	98
第五节 电渗控制在分离中的应用	101
第六节 常用的电渗测定方法	103
参考文献	104
第七章 联用技术	106
第一节 二维毛细管电泳	106
一、二维电泳的特点	106
二、2DCE 接口	107
三、LC-CE	109
四、NGCE-MEKC	109
五、芯片二维技术	112
第二节 毛细管电泳与质谱的联用	113
一、概况	113
二、联用类型	113
三、在线 CE-MS	114
四、离线 CE-MS	125
五、应用举例	126
第三节 毛细管电泳与核磁共振联用	131
一、核磁共振原理	131

二、CE-NMR 结构	134
第四节 毛细管电泳与拉曼光谱联用	140
一、在线联用	140
二、离线联用	142
三、离线 CE-RSD 的操作要点	143
参考文献	147
第八章 芯片电泳	150
第一节 概述	150
第二节 芯片电泳概念及类型	150
一、概念	150
二、芯片 CE 基本类型	151
三、在线集成 CE 芯片	152
四、阵列通道芯片	153
第三节 芯片制作原理	154
一、制作原理与方法	154
二、芯片制作举例	157
第四节 芯片电泳检测技术	165
一、静态 LIF 检测系统	166
二、扫描 LIF 检测系统	166
三、高频电导检测	167
四、电化学检测	168
第五节 芯片电泳进样与分离方法	170
一、芯片电泳的电动进样	170
二、分离	174
三、电源	175
第六节 特殊技术	176
一、整体柱技术	176
二、其他技术	179
第七节 应用	179
一、概况	179
二、蛋白质的快速分离	179
三、PCR-CE 芯片及 DNA 分析	181
四、阵列式高通量分离	185
五、空间分析及其他	189
参考文献	189
第九章 手性分离	192
第一节 手性毛细管电泳分离原理	192

一、手性分离基本策略	192
二、手性消除	192
三、构建手性环境	193
四、不同分离模式手性环境构建	197
第二节 分离条件选择	201
一、基本原则	201
二、选择策略	202
第三节 二元手性添加剂	205
一、二元手性添加剂的构建原理	205
二、二元手性添加剂用于氨基酸对映体分离	206
第四节 手性 CE 的应用与发展动向	210
参考文献	211
第十章 蛋白质分析	214
第一节 基本概念	215
一、蛋白质的淌度	215
二、等电点	216
三、吸附	216
第二节 蛋白质的吸附与控制	216
一、管壁惰化	217
二、样品处理	217
三、缓冲液处理	217
第三节 蛋白质的尺寸分离	219
一、筛分介质选择	219
二、缓冲体系的选择	221
三、进样、温度及其他条件	223
第四节 蛋白质等电聚焦	224
一、操作模式	224
二、谱图记录方法	225
第五节 蛋白质的亲和毛细管电泳	226
一、基本原理	227
二、基本方法	227
第六节 微量制备	227
一、单次收集	228
二、多次重复收集	228
三、多次收集-单次纯化	228
第七节 应用举例	228
一、促红细胞生成素肽谱	228

二、分子量测定	230
三、等电点测定	233
四、其他应用	234
第八节 CE 在蛋白组学研究中的应用	235
一、蛋白质组研究的基本挑战	235
二、CE 方法的特点	236
附记：蛋白组学基础研究方法发展回放	237
参考文献	238
第十一章 DNA 及其碎片分析	240
第一节 DNA 及其片段分离基础	240
一、CE 模式选择	240
二、筛分介质	241
三、缓冲体系	243
四、样品处理及其进样和检测方法	243
第二节 基本应用	245
一、核苷酸分析	245
二、寡聚核苷酸与单链 DNA (ssDNA) 片段分离	248
三、双链 DNA (dsDNA) 分离	250
第三节 DNA 测序	256
一、DNA 测序战略	256
二、DNA 比长测序原理	256
三、CE 测序基本流程	259
四、应用示例	261
参考文献	264
第十二章 糖及其缀合物分析	267
第一节 概述	267
一、糖的分类	267
二、糖分析的问题及研究进展	267
第二节 糖 CE 的基本策略——使糖带电	268
一、络合带电	268
二、强碱电离	270
三、衍生带电	271
第三节 糖的检测	271
一、非衍生糖的检测	271
二、糖的衍生	273
第四节 糖的电泳分离	275
一、基本分离条件	275

二、单糖电泳	275
三、寡糖电泳	277
第五节 糖缀合物的电泳分离	279
一、神经节苷脂分离	279
二、糖蛋白微观不均一性分析	282
参考文献	289
第十三章 小离子与大细胞	291
第一节 红细胞电泳	291
一、背景	291
二、细胞的特点与电动原理	292
三、血红细胞的制备	292
四、电泳操作	293
五、基本结果	294
六、血红细胞电泳的问题与克服方法	296
第二节 细菌及其他颗粒物电泳	297
一、细菌分离的关键条件	297
二、应用概述	301
三、其他颗粒物电泳	302
第三节 单细胞分析	305
一、单细胞进样技术	305
二、应用实例	308
第四节 小离子电泳	311
一、直接检测	312
二、间接紫外检测	313
参考文献	317
结束语	320
符号表	321

第一章 绪 论

第一节 概 述

毛细管电泳 (CE, capillary electrophoresis), 又称高效毛细管电泳 (HPCE, high performance capillary electrophoresis) 或毛细管电分离法 (CESM, capillary electro-separation method), 其中以 CESM 为名最合理, 而以 CE 最简单。人多崇尚简要, 故 CE 之称颇受欢迎, 流行甚广。

毛细管电泳不能顾名思义, 它包容电泳、色谱及其交叉内容, 是一类以毛细管为分离通道, 以高压直流电场为驱动力, 以样品的多种特性 (电荷、大小、等电点、极性、亲和行为、相分配特性等) 为根据的液相微分离分析技术。CE 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。

CE 的出现为微通道芯片的发展奠定了基础。目前的芯片上实验室 (lab-on-a-chip) 或微全分析系统 (μ -TAS, micro-total analysis system), 是 CE 的合理继承和发展。要深刻领会和掌握芯片分析方法, 就必须扎实学习毛细管电泳的理论和实验技巧, 如此方能事半功倍。

一、历史回顾

毛细管电泳源远流长。以等速电泳 (ITP) 为参考点, 可以上溯到 20 世纪 40 年代甚至更远^[1]; 而以采用管式分离通道为起点, 则可以前推至 1927 年前后, 当时, 电泳分析研究的开山祖师 Tesilius 发明了 (U 形) 管式移界电泳术。多数学者认为, 毛细管区带电泳 (CZE) 的发展是现代 CE 的直接源头, 即便如此, 其历史亦可上溯到 20 世纪 60 年代中期^[2,3]。其时, Tesilius 的学生 Hjerten 用内径为 3mm 的石英管来研究细胞的电泳分离, 为锐化区带, 他用甲基纤维素涂布管壁并令分离管绕轴旋转^[4]。该法构思奇巧, 唯操作麻烦, 难以实用, 未见推广。

1970年,等速电泳研究先驱 Everaerts 等,报道了他们关于 ITP 中的 CZE 效应研究^[5],所用方法可为现代 CE 雏形,可惜当时的分离效率低下,不足以引人关注。1974年, Virtanen 认为必须使用细孔毛细管方能提高分离效率^[6],此观点为 Mikkers 等于 1979 年报道的研究所证实^[7]。Mikkers 等一方面从理论上进行研究,揭示了影响 CZE 分离效率的电场聚焦现象;另一方面进行实验研究,以 200 μm ID (内径)的聚四氟乙烯管做电泳,获得了小于 10 μm 板高的高效分离结果^[7],实为 CZE 发展史中的第一个重大突破。1981年, Jorgenson 和 Lukacs 使用 75 μm ID 的熔融石英毛细管做 CZE,以电迁移进样,结合荧光检测,在 30kV 电压下产生了 4×10^5 理论板的空前分离效率^[8],成为毛细管电泳发展史上的一个里程碑。1983年后, Hjerten 先后提出了毛细管凝胶电泳^[9]和毛细管等电聚焦^[10]法,不仅大幅度提高了电泳效率,而且使之可以实现操作自动化,便于定性和定量工作。1984年, Terabe 运用含 SDS 胶束的缓冲液“电泳”分离了中性组分^[11],从而建成了 MECC (胶束电动毛细管色谱),电泳与色谱的完美结合从此开始。1986年, Lauer 报道,蛋白质 CZE 的效率竟然高达 10^6 理论板^[12],逼近理论极限。一时间,关于 CE 的研究急速升温,许多大科学家和分析仪器厂商都先后卷入 CE 研究。随之,商品仪器于 1988 年推出。CE 开始突飞猛进地发展。

国内的 CE 研究首先由竺安教授于 1980 年启动。他先后在中国科学院化学研究所和浙江大学建立了两个研究组,并从 1986 年起陆续在有关会议和杂志上发表研究结果。本书作者有幸从 1984 年开始跟随竺先生从事毛细管电泳研究,尝试了红细胞 CZE^[13~16]、扁毛细管区带电泳^[17~19]、低背景毛细管凝胶电泳和毛细管梯度凝胶电泳^[20~23]等工作。1992 年后,CE 开始在国内受到较广泛的重视,发展很快。1993 年,由中国科学院化学研究所和大连化学物理研究所共同组织,在北京召开了第一届全国毛细管电泳学术讨论会,此后,每两年举行一次。

现在,毛细管电泳已经成为一种相当普遍的微量分离分析方法。随着各相关标准方法的建立和推广应用,毛细管电泳已开始逐渐成为某些标准和常规的分析方法,进入了“寻常百姓”家。

二、发展动向

毛细管电泳研究正在向多种前沿领域推广应用,其中 DNA 与 RNA 分析、复杂药物分析、环境分析、医学(特别是代谢组学与临床医学)研究、蛋白质组(多维)分离、糖组分析、手性分离、单细胞分析等工作进展很快。随着应用研究的推进,方法学本身则又遇到了新问题,其中最突出的是,如何针对各种组学研究的需要,发展高速或高通量的分离方法并对峰进行有效的鉴定。