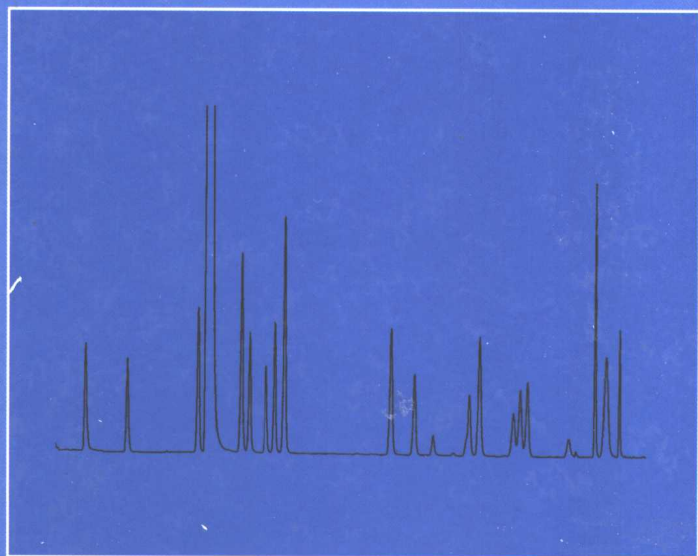


分析化学 **新方法
新技术** 丛书

现代生物样品分离分析方法

张玉奎 等 编著

GH



科学出版社

“十五”国家重点图书出版规划项目

分析化学 新方法
新技术 丛书

现代生物样品分离 分析方法

张玉奎等 编著

科学出版社

北京

内 容 简 介

现代分离分析技术包括高效液相色谱、双向电泳、超临界色谱和毛细管电泳等分离模式,每种分离模式各具特点,在生物样品的分离分析中得到越来越广泛的应用.本书较系统地介绍了这些方法的基本原理、实验技术和最新进展.

本书共分为8章,内容包括:高效液相色谱用于生物样品、手性样品的分离分析;生物样品的离子和离子交换色谱的分离分析;HPLC制备;双向电泳在生物样品分离分析中的应用;生物样品的超临界色谱分离分析;毛细管电泳、电色谱及芯片技术在生物样品分离分析中的应用.

本书可供化学、化工、医药、卫生、生命科学、环境科学等领域的科学研究人员参考,也可作为高等学校相关专业研究生的辅助教材.

图书在版编目(CIP)数据

现代生物样品分离分析方法/张玉奎等 编著. —北京:科学出版社, 2003.3

(分析化学新方法新技术丛书/程介克主编)

ISBN 7-03-011117-6

I. 现… II. 张… III. ①生物化学-分离②生物化学-化学分析
IV. Q503

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2003)第 006495 号

责任编辑:操时杰 / 责任校对:宋玲玲
责任印制:安春生 / 封面设计:王 浩

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>

陈海印刷有限责任公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2003年3月第 一 版 开本:A5(890×1240)

2003年3月第一次印刷 印张:9 1/2

印数:1—3 000 字数:300 000

定价:35.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换〈新欣〉)

本书由

大连市人民政府出版基金资助
国家重点基础研究发展规划项目
“人类重大疾病的蛋白质组学研究”
课题(001GB510202)资助

出版

分析化学 新方法
新技术 丛书

编 委 会

- 顾 问 周同惠 (中国科学院院士,中国医学科学院药物研究所研究员,博士生导师)
- 汪尔康 (中国科学院院士,中国科学院长春应用化学研究所研究员,博士生导师)
- 主 编 程介克 (武汉大学化学系教授,博士生导师)
- 副主编 陈洪渊 (中国科学院院士,南京大学化学系教授,博士生导师)
- 常文保 (北京大学化学系教授,博士生导师)
- 邹汉法 (中国科学院大连化学物理研究所研究员,博士生导师)

前 言

21 世纪将是科学技术迅猛发展的新世纪,被称为“生物工程时代”和“高度信息化时代”.科学技术将成为经济和社会发展的首要动力.“人类有科技就有化学,化学始于分析化学”.

21 世纪分析化学将面临巨大的挑战和机遇.分析化学不断吸取化学、生物、物理和数学等传统学科的最新成就,新兴的纳米技术中微电子学、显微光学及微工程学等微加工技术,正在对分析化学带来巨大的冲击.

21 世纪分析化学将处于广泛的、深刻的、激烈的巨大变革时期,不断向微型化(纳米芯片、生物芯片及芯片上实验室)、仿生化(电子鼻和电子舌等传感器)、自动化(原位及体内实时在线监测)、信息化(临床、环境及生产过程监测的网络化)的方向发展.现代分析化学已成为科学技术和经济发展的重要基础,也是衡量一个国家科学技术发展水平的主要标志之一.

1979 年以来,为了适应我国生产、教学和科学研究的需要,科学出版社已陆续出版了一套比较系统、完整的《分析化学丛书》,深受广大读者喜爱和好评,有力地推动了我国分析化学的发展.

十多年来,科学技术日新月异,分析化学新方法和新技术不断推陈出新,分析化学整个面貌已发生了巨大的变化.为了更好地适应我国生产、教学和科学研究工作的需要,及时总结国内外的最新成就和研究成果,科学出版社计划组织出版一套《分析化学新方法新技术丛书》.为此,专门成立了编委会,确定了撰写这套丛书的方针和任务;推荐高等院校和科学研究单位的分析化学专家分头撰写,由科学出版社陆续出版.

本丛书突出一个“新”字,旨在反映新方法、新技术、新进展、新应用,鼓励学科之间交叉及渗透,不拘一格,充分体现 21 世纪分析化学的先进性、前沿性、创见性和代表性.力求选题新颖,立论严谨;论据充足,结构合理;兼收并蓄,着意创新;深入浅出,文字通顺;科学性和实用性并重.使生产、教学和科研战线上的广大读者,都能获得新理论、新知识和新技能,对工作有所帮助,以推动我国分析化学的新发展.

由于编者水平所限,经验不足,本丛书各分册中难免有缺点和错误,诚恳欢迎读者批评指正,以使这一套丛书越出越好.

《分析化学^{新方法}新技术^{丛书}》
编委会

序 言

近年来,随着生命科学的发展,对于分离分析手段的要求越来越高,同时也促进了分析方法的发展。毛细管电泳技术的出现,为生物样品的分析提供了又一强有力的工具。毛细管芯片技术的发展使得人类基因组工程得以提前数年完成。生物芯片已成为目前最活跃的研究领域;而多维平面电泳在蛋白组研究方面正在发挥巨大的作用。生物工程产业化的推进,离子交换色谱、制备色谱和模拟流动床技术发挥了巨大的威力。超临界色谱技术在经过近 20 年的发展,已逐步趋于成熟,在天然药物中活性组分的制备、复杂生物产品的分级等方面的作用已引起人们的广泛关注。本书将囊括在生命科学中广泛应用的高效液相色谱、毛细管电泳及芯片、模拟流动床等现代分离分析手段,在一般性介绍这些新技术基本原理和实验方法的基础上,以翔实的分离分析实例说明具体的方法建立程序。本书的应用实例力求出自作者自己的研究工作,针对国内读者群的特点,本着新颖、实用的原则,使之既可作为一般方法建立的工具书,又能够提供给读者不同模式目前国内外研究的最新信息和发展趋势。在具体内容的选择上,以新视角、新思路、新知识入篇,以保证本书的创新性。力求“求全而不流于滥”,兼顾系统的完整性、全面性且篇幅得当,达到全面与简约的相对统一。

参加本书编写的作者皆为国内该领域工作在科研第一线,并已取得了一定成绩的中青年科学工作者。全书共分 8 章,分别由张庆合、张玉奎(第一章)、屈锋(中国科学院生态环境研究中心)(第二章)、张玉奎、邹汉法、张曾子、李彤、张维冰(第三章)、杨长龙(大连理工大学)、张玉奎(第四章)、万应涛(军事医学科学院)、李蕾(军事医学科学院)、钱小红(军事医学科学院)(第五章)、张玉奎、张维冰(第六章)、江正瑾(Unimicro Technologies Inc.)、蒋春(Unimicro Technologies Inc.)、闫超(Unimicro Technologies Inc.)(第七章)、张玉奎、张丽华(第八章)撰写(未注明单位的作者均为中国科学院大连化学物理研究所)。最后由张玉奎汇总定稿。

在编写本书的过程中,得到了中国科学院大连化学物理研究所同仁的大力支持和帮助,卢佩章院士对本书的出版给予了热情关注.在此,作者一并表示由衷的感谢.

由于时间较为仓促,书中谬误和不当之处在所难免,恳请读者批评指正.

作 者

2002 年秋于大连

目 录

第一章 高效液相色谱用于生物样品的分离分析	(1)
§ 1.1 液相色谱分离生物样品的基本原理和特征	(1)
§ 1.1.1 生物样品的基本特性	(2)
§ 1.1.2 生物样品的处理方法	(3)
§ 1.1.3 生物样品分离对固定相的要求	(4)
§ 1.1.4 生物样品的检测	(7)
§ 1.2 生化样品分析常用的 HPLC 模式	(7)
§ 1.2.1 反相色谱法	(8)
§ 1.2.2 离子交换和离子色谱法	(9)
§ 1.2.3 离子对色谱法	(10)
§ 1.2.4 体积排除色谱法	(10)
§ 1.2.5 疏水作用色谱	(12)
§ 1.2.6 亲合色谱法	(12)
§ 1.3 氨基酸、肽和蛋白质的分离分析	(15)
§ 1.3.1 氨基酸分析	(16)
§ 1.3.2 肽和蛋白质的分离分析	(18)
§ 1.4 核酸及 DNA 分离	(24)
§ 1.4.1 碱基、核苷、核苷酸和核酸的分析	(25)
§ 1.4.2 DNA 的分离分析	(26)
§ 1.5 糖类及其有关化合物	(28)
§ 1.6 生物样品的 HPLC 分析新技术	(32)
§ 1.6.1 二维液相分离	(32)
§ 1.6.2 快速分离技术	(35)
参考文献	(37)
第二章 生物样品的离子和离子交换色谱的分离分析	(39)
§ 2.1 离子交换色谱和离子色谱的特点及应用	(39)

§ 2.2 离子交换色谱	(40)
§ 2.2.1 离子交换色谱分离机理与影响因素	(40)
§ 2.2.2 色谱固定相	(45)
§ 2.2.3 色谱流动相	(48)
§ 2.2.4 分离条件选择	(48)
§ 2.2.5 离子交换色谱在生物样品分析中的应用	(51)
§ 2.3 离子色谱	(72)
§ 2.3.1 离子色谱分离机理	(72)
§ 2.3.2 离子色谱常用检测器	(73)
§ 2.3.3 离子色谱在生化分析中的应用	(74)
参考文献	(77)
第三章 液相制备色谱与模拟移动床技术	(82)
§ 3.1 液相制备色谱技术	(82)
§ 3.1.1 液相制备色谱填料	(83)
§ 3.1.2 液相制备色谱柱技术	(85)
§ 3.1.3 进样和进样分布	(86)
§ 3.1.4 液相制备色谱的检测和操作自动化	(87)
§ 3.1.5 液相制备色谱的工艺流程	(87)
§ 3.2 模拟移动床色谱及其在手性药物大规模拆分中的应用	(90)
§ 3.2.1 模拟移动床色谱的分离原理	(91)
§ 3.2.2 模拟移动床色谱的仪器装置	(93)
§ 3.2.3 操作参数的确定	(94)
§ 3.2.4 应用实例	(96)
§ 3.3 双柱切换制备系统及其在手性样品分离中的应用	(97)
§ 3.3.1 双柱切换制备系统的分离原理	(97)
§ 3.3.2 双柱切换制备系统的工艺流程	(99)
§ 3.3.3 应用双柱切换制备系统分离手性样品	(100)
§ 3.4 径向色谱在生物样品分离中的应用	(102)
参考文献	(107)
第四章 生物样品的超临界流体色谱分离分析	(110)
§ 4.1 超临界流体色谱的基本原理	(110)

§ 4.1.1	超临界现象和超临界流体的特征	(110)
§ 4.1.2	超临界流体色谱的特点	(112)
§ 4.1.3	流动相及改性剂	(114)
§ 4.1.4	色谱柱和固定相	(117)
§ 4.2	超临界流体色谱仪器	(119)
§ 4.2.1	SFC的一般流程	(119)
§ 4.2.2	SFC流动相输送系统	(120)
§ 4.2.3	SFC分离系统	(121)
§ 4.2.4	SFC检测系统	(122)
§ 4.3	SFC联用技术	(122)
§ 4.3.1	SFC-MS联用	(122)
§ 4.3.2	SFC-FTIR联用	(125)
§ 4.3.3	SFC-NMR联用	(127)
§ 4.4	超临界流体色谱的应用	(128)
§ 4.4.1	糖类	(128)
§ 4.4.2	脂肪酸和酯类	(129)
§ 4.4.3	甘油酯	(132)
§ 4.4.4	甾类化合物	(133)
§ 4.4.5	维生素	(134)
§ 4.4.6	氨基酸、肽、蛋白质	(136)
§ 4.4.7	药物	(138)
§ 4.4.8	手性对映体	(141)
§ 4.4.9	展望	(145)
	参考文献	(145)
第五章	双向电泳在细胞蛋白质分离中的应用	(148)
§ 5.1	概述	(148)
§ 5.2	一向等电聚焦(IEF)电泳	(150)
§ 5.2.1	IEF凝胶制备	(151)
§ 5.2.2	样品制备与加样	(152)
§ 5.2.3	运行	(154)
§ 5.2.4	IPG胶条的平衡	(155)
§ 5.3	二向 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳	(156)

§ 5.4 胶上蛋白的检测	(157)
§ 5.4.1 考马斯亮蓝染色	(158)
§ 5.4.2 银染	(159)
§ 5.4.3 负染	(162)
§ 5.4.4 荧光染色	(162)
§ 5.5 存在问题	(163)
§ 5.6 双向电泳技术的改进	(163)
§ 5.6.1 三步提取法	(163)
§ 5.6.2 亚细胞器分离	(164)
§ 5.6.3 窄范围 pH 胶条的使用	(164)
§ 5.6.4 胶上差示电泳 DIGE 技术	(165)
§ 5.6.5 虚拟双向技术	(166)
§ 5.7 展望	(167)
参考文献	(167)
第六章 毛细管电泳在生物样品分析中的应用	(169)
§ 6.1 毛细管电泳原理与装置	(169)
§ 6.1.1 基本原理	(169)
§ 6.1.2 毛细管电泳仪器系统	(175)
§ 6.2 毛细管电泳在氨基酸、肽及蛋白质分析中的应用	(178)
§ 6.2.1 氨基酸分析	(178)
§ 6.2.2 肽的分析	(181)
§ 6.2.3 蛋白的 CE 分析	(182)
§ 6.3 DNA 与核苷分析	(188)
§ 6.3.1 核苷酸分析	(188)
§ 6.3.2 寡聚核苷酸与单链 DNA(ssDNA)片段分离	(189)
§ 6.3.3 双链 DNA 分离	(190)
§ 6.3.4 大片段 DNA(>2kbp)分离	(193)
§ 6.3.5 DNA 测序	(193)
§ 6.3.6 毛细管电泳 DNA 片段多态性分析	(195)
§ 6.4 糖类样品的毛细管电泳分析	(198)
§ 6.4.1 糖的毛细管电泳分离	(198)
§ 6.4.2 糖的检测方法	(203)

§ 6.5 毛细管电泳手性分离	(208)
§ 6.5.1 毛细管电泳手性分离原理	(208)
§ 6.5.2 手性分离条件的选择	(209)
§ 6.5.3 手性毛细管电泳的应用与发展动向	(214)
§ 6.6 多维毛细管电泳分离	(218)
§ 6.6.1 矩形通道晶片平面二维电泳	(219)
§ 6.6.2 柱切换二维毛细管电泳分离	(221)
§ 6.6.3 多维立体毛细管电泳分离模式的构想	(224)
参考文献	(230)
第七章 毛细管电色谱及其在生物样品中的应用	(236)
§ 7.1 毛细管电色谱简介	(236)
§ 7.1.1 毛细管电色谱的历史	(238)
§ 7.1.2 毛细管电色谱的特点	(238)
§ 7.1.3 毛细管电色谱的分类	(239)
§ 7.1.4 展望	(239)
§ 7.2 毛细管电色谱仪器	(240)
§ 7.2.1 进样系统	(241)
§ 7.2.2 毛细管电色谱柱分离系统	(241)
§ 7.2.3 检测系统	(243)
§ 7.3 毛细管电色谱在氨基酸分离分析中的应用	(244)
§ 7.4 毛细管电色谱在肽和蛋白质分离分析中的应用	(248)
§ 7.5 毛细管电色谱在糖类分离分析中的应用	(252)
参考文献	(255)
第八章 微流控芯片在生物样品分离分析中的应用	(261)
§ 8.1 微流控芯片的制备	(261)
§ 8.1.1 照相平板印刷方法制备玻璃芯片	(262)
§ 8.1.2 聚合物芯片的制备方法	(263)
§ 8.2 毛细管电泳芯片	(266)
§ 8.2.1 毛细管电泳芯片的构型	(266)
§ 8.2.2 进样和流体控制	(268)
§ 8.2.3 检测系统	(269)
§ 8.2.4 CAE 芯片	(271)

§ 8.2.5 毛细管电泳芯片的集成系统·····	(273)
§ 8.2.6 毛细管电泳芯片的应用·····	(275)
§ 8.3 毛细管电色谱芯片·····	(277)
§ 8.4 其他类型的微流控芯片·····	(279)
§ 8.4.1 流体控制系统的微型化·····	(279)
§ 8.4.2 样品固相萃取的微型化·····	(279)
§ 8.4.3 PCR 芯片·····	(280)
§ 8.4.4 分析芯片·····	(281)
§ 8.5 结束语·····	(282)
参考文献·····	(282)

第一章 高效液相色谱用于生物样品的分离分析

高效液相色谱法作为一种分离方法,利用物质在两相中吸附或分配系数的微小差异达到分离的目的.当两相作相对移动时,被测物质在两相之间进行反复多次的分配,这样使原来微小的分配差异产生了很大的效果,达到分离、分析及测定一些物理化学常数的目的.

目前,液相色谱在生命科学中已显示出突出的地位. HPLC 用于生物化学样品分析始于 20 世纪 70 年代中期,80 年代针对生命科学领域分离和制备而设计的生物色谱填料为生命科学的发展做出了巨大贡献,同时也为 HPLC 在生命科学研究领域的地位奠定了坚实基础;90 年代,随着生物医药研究与开发的迅猛发展,各种类型的高通量及手性色谱柱纷纷出现.目前采用 HPLC 进行分析、分离和纯化生物大分子物质是极为活跃的研究领域,是生物化学、生物工程、制药等领域倍受关注的技术.

§ 1.1 液相色谱分离生物样品的基本原理和特征

液相色谱中包括多种分离模式,一般可以按照表 1.1 的方法进行分类.

表 1.1 液相色谱法分类

按固定相形态分类	按作用原理分类		按物理特征分类	
	原 理	名 称	特 征	名 称
液体(液-液色谱)	分配	液-液分配色谱	平面固定相	平面色谱
固体(液-固色谱)	吸附	液-固吸附色谱	纸固定相	纸色谱
	分子大小	凝胶渗透或体积排除色谱	薄层固定相	薄层色谱
	离子交换能力	离子交换色谱	颗粒固定相填充	填充色谱
	亲和力	亲和色谱	色谱柱中空	空心柱色谱
	电渗及电泳淌度	电泳	流动相采用高压液体	高压液相色谱

色谱法具有高效、快速、灵敏的特点,液相色谱与气相色谱相比,液相色谱的最大特点是可以分离不可挥发而具有一定溶解性的物质或受热后不稳定的物质,而这类物质在已知化合物中占有相当大的比例.

§ 1.1.1 生物样品的基本特性

生化混合物样品与 HPLC 分离的其他样品差异较大,生物大分子在水环境中一般具有稳定的三维构象^[1],图 1.1 所示为蛋白质的各种构象状态,一级结构(primary structure)指多肽链共价主链的氨基酸序列;二

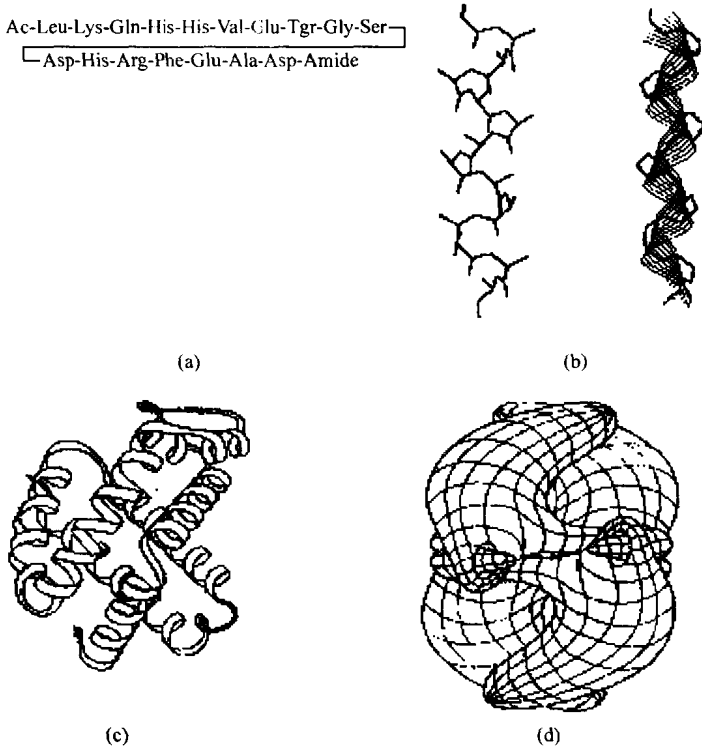


图 1.1 多肽结构^[2,3]

(a)多肽中的氨基酸的线性排列决定一级结构;(b)由 14 个残基的丙氨酸(自)低聚体形成的条形 α -螺旋二级结构和带状螺旋覆盖于惟一骨架上的氨基酸序列;

(c)血红蛋白的 β -亚基骨架的带状结构^[3];(d)多重亚基酶触酶。

级结构(secondary structure)是指多肽链借助氢键排列成沿一维方向具有周期性结构的构象;三级结构(tertiary structure)是指多肽链借助各种次级键(非共价键)盘绕成具有特定肽链走向的紧密球状构象,三级结构中除属于二级结构的 α -螺旋和 β -折叠片等有规则的构象外,还有无规则的松散肽段;四级结构(quarternary structure)是指寡聚蛋白质中各亚基之