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　　文字编辑：李锦侠
责任校对：陶燕华　　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

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。

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，感谢刘国诠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～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）

在20世纪80年代初，首次出现了液相色谱与核磁共振波谱的联用（LC-NMR）技术。经过不断改进和完善，全自动操作、常规使用的LC-NMR已遍及全世界。众所周知，LC是分离复杂混合物的最好方法，而NMR是结构分析强有力的工具，两者联用是科学家们长期以来的愿望。但NMR灵敏度低、氘代溶剂价格昂贵等因素，曾使两者的联用技术发展缓慢。NMR技术的迅猛发展，使LC-NMR联用技术得到实质性突破，成为真正全自动、常规使用的LC-NMR。使用LC-NMR鉴定药物中杂质的方法已经很常见了[25]。

LC-NMR系统中液相色谱包括：LC自动进样器、LC泵、色谱柱和恒温箱，以及非NMR检测器，如：UV（紫外可见）、DAD（二极管阵列）、EC（电导）、折射率等。流动相从检测器进入LC-NMR接口，接口中附设了用于中间存储LC色谱峰馏分的环路（LOOP），然后从LC-NMR接口出来至NMR探头或废液收集器。通过探头后，流动相进入馏分收集器回收，并进一步用各种NMR技术对各色谱峰进行研究。在NMR检测的过程中常采用停止流动模式（BSFU），可自动检测样品中的每一组分，当最高点达到NMR检测池中心位置时自动停止流动，进行NMR采样，直到取得好的NMR谱图后，泵又重新启动，进行下一个色谱峰检测（在停止流动后不会影响下一次NMR检测）。在LC与NMR接口处的分流器（splitter）上还可连接质谱仪，进一步成为LC-NMR-MS联用仪。LC-NMR-MS技术的优势在于MS作为检测器，得到的结构信息多，具有高灵敏度和较多分子碎片信息。所以改进了LC峰收集过程中的选择性，如尿液中的药物代谢物，有选择地找到了与之相关的LC峰。由NMR、MS和DAD一次得到全部结构信息。大多数情况下，特别是在二维或多级质谱下，有足够的信息可以确定结构。因为NMR、MS和DAD同时测定，使样品分解的可能性减小，增加了结构分析的可靠性[26]。目前已在聚合物化学、药物分析以及临床分析中得到广泛的应用。

第二节　气相色谱及其联用技术

气相色谱也是色谱中的一种，即用气体作为流动相的色谱法。气相色谱的优点[27]是分析速度快，分离效率高，灵敏度高。其原因是由于气态样品的传递速度快，组分可以很快地在气体和液体之间建立平衡；同时气体作为载气，其阻力小，可以用高载气速度进行冲洗，因而形成了气相色谱的高速分离。同样，气相色谱的分类也可根据固定相的状态、分离的过程以及固定相的种类来划分：按固定相聚集态可分为气固色谱和气液色谱，前者固定相是固体吸附剂，后者固定相是涂在载体表面的液体；按分离过程中的物理化学原理可分为吸附色谱和分配色

谱；按动力学过程原理可分为冲洗色谱、取代色谱及迎头色谱。虽然气相色谱可选择的种类很多，但其分析的组分必须能够气化，这就严重限制了它的广泛应用，对高沸点或不稳定的化合物就不能直接进行分析，往往需要进行衍生化才能分析，无疑将导致分析过程的繁琐耗时。GC 在药物分析、环境分析方面，以及医学和生物领域都得到了长足的发展[28]。

一、色谱柱

气相色谱的色谱柱一般分为填充柱和毛细管柱。色谱柱的选择会直接影响混合物中组分的分离。对于填充柱而言，可选择的固定相较多（主要有活性炭、石墨、硅胶、氧化铝、分子筛以及多孔聚合物等），柱容量较大，但是受柱长的限制，分离能力有限，主要应用于简单化合物的分离。对于毛细管柱而言，内径小，分辨能力高，但是负载量低。

二、检测器

已报道的气相色谱的检测器有 30 多种，最为常用的有热导检测器（TCD）、氢火焰离子化检测器（FID）、电子俘获检测器（ECD）、光电离检测器（PID）、火焰光度检测器（FPD）、氮磷检测器（NPD）、原子发射检测器（AED）和电导检测器（ELCD）等。

热导检测器是根据每一种物质都具有导热的能力，气体组成不同则导热能力不同而设计的。通常可检测到 10^{-6} 水平的低含量组分，并且稳定性高。氢火焰离子化检测器（FID）是一种应用广泛的离子化检测器，它以氢气在空气中燃烧生成的火焰为能源，当有机物进入火焰时发生解离生成负离子。离子在火焰周围设定电场的作用下发生定向移动形成离子流。氢火焰检测器属于质量型检测器，只对含碳的物质有响应，一般适用于分析有机化合物。该检测器灵敏度高，最低检测限达 10^{-9} 级，线性范围宽，可达 10^{7}。电子俘获检测器（ECD）是一种放射性离子化检测器，是在放射源的作用下，使通过检测器的载气发生电离，产生自由电子，在电场作用下形成基流。当电负性高的化合物通过检测器时捕获自由电子，使基流下降形成检测信号。这种检测器是高选择性的检测器，对含有卤素、硫、磷的化合物或甾体化合物等这类含有很高电负性的化合物具有很高的灵敏度，但线性范围小，只有 10^{3}。

三、选择气相色谱分离条件的一般原则

选择适当的分析条件，是气相色谱分离的关键，包括选用合适的固定相、色谱柱的温度和载气的条件。固定相的选择，采用性质相近的原则，即分离极性化合物时选用极性固定相，分离非极性化合物时选用非极性固定相。对于复杂的混

合物，一般沸程较长，宜选用程序升温的方式进行分离，但初始的温度不能太高，否则会影响到低沸点化合物的分离。根据被分离组分和固定液分子间的相互作用关系，固定液的选择一般根据所谓的“相似性原则”，即固定液的性质与被分离组分之间的某些相似性（如官能团、化学键、极性、某些化学性质等），性质相似时，两种分子间的作用力强，被分离组分在固定液中的溶解度大，分配系数大，因而保留时间长；反之溶解度小，分配系数小，因而能很快流出色谱柱。

分离极性化合物，采用极性固定液。这时样品各组分与固定液分子间的作用力主要是定向力和诱导力，各组分出峰次序按极性顺序，极性小的先出峰，极性越大，出峰越慢；分离非极性化合物，应用非极性固定液，样品各组分与固定液分子间的作用力是色散力，没有特殊选择性，这时各组分按沸点顺序出峰，沸点低的先出峰。对于沸点相近的异构物的分离，效率很低；分离非极性化合物和极性化合物的混合物时，可用极性固定液，这时非极性组分先馏出，固定液极性越强，非极性组分越易流出；对于醇、酚、胺等能形成氢键的样品一般选择极性或氢键型的固定液，这时根据组分和固定液分子间形成氢键能力的大小进行分离。“相似相容性原则”是选择固定液的一般原则，有时利用现有的固定液不能达到满意的分离结果时，往往采用“混合固定液”，应用两种或两种以上性质各不相同的，按适合比例混合的固定液，使分离有比较满意的选择性。

作为气相色谱载气的气体，需要化学稳定性好、纯度高、价格便宜并易取得且能适合于所用的检测器。常用的载气有氢气、氮气、氩气、氦气、二氧化碳等。

四、气相色谱联用技术

1. 气相色谱-质谱联用（GC-MS）

气-质联用技术综合了气相色谱和质谱的优点，弥补了各自的缺陷，因而具有灵敏度高、分析速度快、鉴别能力强的特点，可同时完成待测组分的分离和鉴定，特别适用于多组分混合物中未知组分的定性和定量分析，判断化合物的分子结构，准确地测定化合物的分子量，是目前能够为痕量样品提供结构信息的工具。因此在测定生物样品和体液中药物、代谢物的痕量分析以及石油、化工、环保、医药卫生等学科中都有广泛的应用[29~32]。对低沸点、低挥发性的成分可直接进行定性定量分析；对不挥发性成分和热不稳定的物质，可进行适当的衍生化，变成易于挥发的衍生物再进行分析。

2. 气相色谱-傅里叶变换红外光谱联用（GC-FTIR）

红外光谱提供了极其丰富的分子结构信息，几乎没有两种不同的物质具有完全相同的红外光谱，所以红外光谱是一种十分理想的定性分析工具。然而，红外光谱法原则上只能用于纯化合物，对于混合物的定性分析常常是无能为力的。

将色谱法分离混合物的优点与红外光谱法定性和结构分析的优点结合形成一种联用方法，即把色谱仪作为红外光谱仪的前置分离工具，把红外光谱仪作为色谱仪的检测器，即为常用的 GC-FTIR 联用仪。

GC-FTIR 系统由气相色谱，接口和 FTIR 三部分组成。气相色谱多采用毛细管气相色谱仪，可带有热导检测器、氢火焰离子化检测器等，其作用是将混合样品中的各组分进行分离。接口是联用系统的关键部分，目前已有光管接口和冷冻捕集接口两种类型，后者可以使联机系统具有更高的信噪比，但由于其价格昂贵，至今普遍使用的仍是相对廉价的光管接口，分离鉴定十分方便。GC-FTIR 是一种与 GC-MS 互补的分离鉴定手段，尤其是对异构体鉴定有其独特的优势。GC-FTIR 在分析中已得到广泛应用，并具有美好前景[33,34]。

参 考 文 献

1 贺浪冲. 色谱分析发展简史及文献. 西北药学杂志，1996，11 (S1)：59～61

2 Snyder L R，et al. Introduction to modern liquid chromatography. 2nd. New York：Wiely Interscience，1979

3 林炳承等. 高效液相色谱在生命科学中的应用. 济南：山东科学技术出版社，1996

4 Skoog D A，et al. Principle of instrumental analysis. 5 edition. New York：Saunder college publishing，1997

5 Scott R W. Liquid chromatography for the anlyst. New York：Marcel Dekker，1994

6 Brown P R. High-Performance Liquid Chromatography：Past Developments，Present Status，and Future Trends，Anal. Chem，1990，62：995A

7 Dorsey J G，Cooper W T. Retention mechanisms of bonded-phase liquid chromatography. Anal Chem，1994，66 (17)：857A

8 Krstulovic A M，Brown P R. Reversed-phase liquid chromatography. New York：Wiley，1982

9 Snyder L R，Glajch J L，Kirkland J J. Practical HPLC Method Development. New York：Wiely，1988

10 Glajch J L. Optimization of solvent strength and selectivity for reversed-phase liquid chromatography using an interactive mixture-design statistical technique. *J Chromatogr*，1980，199：57～79

11 Jandera P，Kuč erová M，Holiková J. Characterization and prediction of retention in gradient-elution normal phase HPLC with ternary gradients，*Chromatographia*，1997，45 (1)：163

12 Marshak D R，Kadonaga J T，Burhuess R R，et al. Strategies for Protein Purification and Characterrization：A Laboratory Course Manual，Matthews：Cold Spring Harbor Laboratory Press，1996

13 Brone P R. HPLC in Nucleic Acid Research：Methods and Applications. New York：Marcel Dekker Inc，1984

14 朱彭龄等. 现代液相色谱. 兰州：兰州大学出版社，1989

15 Levine S P，Wohl H. *J. BiolChem*，1976，2：51

16 Kramer K. *Environ Sci Technol*. 2002，36 (22)：4892～4898

17 Gupalova T V，Lojkina O V，Palagnuk V G，et al. *J Chromatogr A*，2002，949 (1～2)：185～193

18 Schmidt J J，Stafford R G. *FEBS Lett*，2002，532 (3)：423～426

19 Niessen W M A，Tinke A P. Liquid chromatography-mass spectrometry General principles and instrumentation. *Journal of Chromatography A*，1991，703 (1～2)：37～57

20 Niessen W M A. State-of-the-art in liquid chromatography-mass spectrometry，*Journal of Chromatography A*，1999，856：179～197

21　Carrascal M，Schneider K，Calaf R E. Quantitative electrospray LC-MS and LC-MS/MS in biomedicine. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*，1998，17：1129～1138

22　Hernando M D，Petrovic M，Fernández A R，et al. Analysis by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry and acute toxicity evaluation for β-blockers and lipid-regulating agents in wastewater samples. *Journal of Chromatography A*，2004，1046（1～2）：133～140

23　Zhang Y，Zhang G and Zhang Y. Occurrence and analytical methods of acrylamide in heat-treated foods. *Journal of Chromatography A*，2005，1075（1～2）：1～21

24　Sin D，Ho C，Wong Y，et al. Analysis of major components of residual bacitracin and colistin in food samples by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*，2005，535（1～2）：23～31

25　Roberts J K，Smith R J. Use of liquid chromatography-nuclear magnetic resonance spectroscopy for the identification of impurities in drug substances，*Journal of Chromatography A*，1994，677（2）：385～389

26　http：//www. bruker. com. cn

27　刘虎威. 气相色谱方法及应用. 北京：化学工业出版社，2000

28　傅若农. 色谱分析概论. 第二版. 北京：化学工业出版社，2005

29　傅若农. 近两年国内气相色谱的应用进展. 分析实验室，2005，24（4）：75～92

30　李霞，唐玉海，郑晓晖. 气相色谱-质谱联用法在体内药物分析方面的应用. 中国药业，2004，13（4）：79～80

31　季怡萍. 气相色谱-质谱中定量分析技术的应用. 光谱实验室，2002，19（2）：189～194

32　Parveen I，Moorby J M，Fraser M D，et al. Application of gas chromatography-mass spectrometry metabolite profiling techniques to the analysis of heathland plant diets of sheep. *J Agric Food Chem*，2007，21；55（4）：1129～1138

33　Sasaki T A，Wilkins C L. Gas chromatography with fourier trans-form infrared and mass spectral detection. *J Chromatogr*，1999，842：341～349

34　徐新元. 气相色谱（GC）、红外光谱（FTIR）联用技术及其在药物分析中的应用. 中成药，2001，23（6）：439～441

第二章　脱氧核糖核酸（DNA）的电泳与色谱分析

第一节　DNA 的提取和 PCR 扩增

一、概述

每种生物中都含有脱氧核糖核酸（deoxyribonucleic acid，DNA），虽然核糖核酸（ribonucleic acid，RNA）在某些病毒中也可以携带遗传信息，但 DNA 却是更广泛的遗传信息的储存者。它使每个生物独具特性，并能遗传其健康状况及生活习性。每个正常人都有携带遗传信息的 23 对染色体——一半来自母亲，另一半来自父亲。不同人的基因组序列有 99.9％是相同的，不论他们彼此是否有关系，其 DNA 组成的差别很小[1]。有成千上万个 DNA 分子（片段），某些对了解遗传史至关重要，而大多数还没有被完全了解。有些被称为“垃圾 DNA”，曾被视为无用信息，对其确切的作用还缺乏足够的了解，而对那些与蛋白质有关的 DNA 已经进行了大量研究[2]。1953 年 James Watson 和 Francis Crick[3] 首次报道了脱氧核糖核酸（DNA）是一种包含遗传信息的双螺旋分子。这种 DNA 双螺旋由一对分子组成，其序列就是基因图谱，它们是由四种碱基，即腺嘌呤（adenine，A）、胞嘧啶（cytosine，C）、鸟嘌呤（guanine，G）和胸腺嘧啶（thymine，T）按一定排列顺序组成的。这些碱基互补配对：A＋T、T＋A、C＋G、G＋C，构成双螺旋结构。

人类基因组计划（human genome project）就是对整个人类基因组 30 亿 DNA 碱基的序列进行测定。为了提高序列测定的通量，降低成本，DNA 分析技术已越来越受到关注，这也是分析化学的一个重要课题。随着 2003 年人类基因组计划的完成，DNA 分析技术仍将在研究基因组中所蕴涵大量信息的后基因时代发挥重要作用。单链 DNA 和双链 DNA 分子的分析不仅与人类基因组图谱绘制或序列再测定密切相关，而且在基因分离、遗传性疾病、病毒感染的诊断、反义治疗以及司法鉴定等应用中都十分重要[4]。通过 DNA 分析，我们可以知道，在一个较长的 DNA 序列中是否存在某个特殊的 DNA 序列，序列的变异与特定疾病状态有什么关系等。通常，DNA 分析

需要先从生物样品中进行 DNA 纯化，然后通过聚合酶链反应（PCR）对选定的 DNA 片段进行扩增，再用色谱或电泳对 DNA 片段进行分析，最后进行 DNA 杂交或序列测定。这些过程既繁琐又费时，因此，建立操作简便、安全、低成本、可靠、高通量的 DNA 分析方法一直是备受关注的重要课题。

二、DNA 提取

大多数 DNA 分析都需要用聚合酶链反应（PCR）对特定的 DNA 片段进行体外扩增，以增加其拷贝数。进行这一反应需要的是聚合酶、三磷酸脱氧核苷（dNTPs）、引物和 DNA 模板[5]。因此，从血液或其他生物样品中制备出适合进行 PCR 的高质量 DNA 模板，是非常重要的一步，通过这一步骤不仅可以提高 DNA 的浓度，还可以去除 PCR 反应的抑制物。抑制 PCR 扩增的物质包括血色素及其降解产物（卟啉化合物）、胆汁酸、抗凝物质、肝磷脂，以及一些唾液、羊水、血清、脑脊液和尿液中存在的未知物[6]。虽然有几种一步预处理方法，如热处理、超声、微波处理、冻融、碱变性和蛋白质盐析等，但这些方法都不能将 PCR 抑制物完全除去[6,7]。要提取出适合 PCR 反应的高质量 DNA 需要采用一种多步骤方法，包括有机溶剂提取、离心和/或固相萃取。酚-氯仿提取法是目前临床样品分子诊断分析中 DNA 提取的常用方法，包括几步离心，要用到毒性较大的苯酚和氯仿（三氯甲烷）[5]。另一种技术是等密度离心，以氯化铯作为离心介质，在离心场中可自行调节形成浓度梯度，并能保持稳定。在氯化铯形成的密度梯度中，离心管顶部的密度为 1.65g/cm^3，底部为 1.75g/cm^3。而 DNA 的密度是 1.70g/cm^3，会停留在离心管的中部，但这种方法不仅相当费时，而且还需要超速离心和昂贵的试剂。

DNA 提取中常使用硅胶、玻璃纤维、阴离子交换树脂、磁珠等固相填料[8~17]。最常用的是阴离子交换树脂、硅胶和玻璃纤维棉。在中性 pH 和低离子强度的缓冲液中，带负电荷的核酸与含二乙氨基乙基（DEAE）基团的带正电荷的树脂相结合。然后用较高离子强度的缓冲液把吸附的其他细胞内的杂质洗脱下来，如蛋白质和 RNA。再提高洗脱液的盐浓度，把 DNA 从阴离子交换树脂上洗下来，得到较高纯度的 DNA。由于接下来的 PCR 需要在特殊的低离子强度缓冲液中进行，洗脱下来的 DNA 还要经过乙醇沉淀，用低离子强度缓冲液重新溶解，才能进行 PCR 扩增。

DNA 提取常用的另一种固相填料是硅胶类填料。DNA 和 RNA 在变性剂作用下与硅胶、硅藻石（celite）或玻璃粉（glass powder）相结合，变性剂包括碘化钠、高氯酸钠、盐酸胍和硫氰酸胍等[10]。结合的机制是在高浓度的变性剂中，DNA 或 RNA 被选择性地吸附于填料表面[8]，用低离子强度的缓冲液或水可以把结合上的核酸（DNA 和 RNA）洗脱下来。洗脱下来的 DNA 溶液，不需要进