

毛细管电泳 激光诱导荧光检测肌腱和肌腱细胞中的羟脯氨酸

邹晓莉 周春艳 黎源倩* 曾红燕

(四川大学华西公共卫生学院卫生检验教研室,成都 610041)

摘要 建立毛细管电泳 激光诱导荧光检测 (CE-LIF) 分析羟脯氨酸的方法。肌腱和肌腱细胞中的胶原蛋白碱水解生成氨基酸,经异硫氰酸荧光素 (FITC) 衍生,采用 LIF-CE 分离测定胶原蛋白特异性氨基酸 羟脯氨酸。羟脯氨酸在 $0.5 \mu\text{g/L} \sim 8 \times 10^3 \mu\text{g/L}$ 浓度范围内线性关系良好;检出限为 $0.5 \mu\text{g/L}$ 。相对迁移率和相对峰高的相对标准偏差 (RSD) 分别为 5.0% 和 6.1%。测定了 60 份肌腱和 9 份细胞样品,加标回收率为 95% ~ 110%。将所建立的毛细管电泳方法与高效液相色谱法 (HPLC) 进行比较,两者测定结果相对误差为 -1.9% ~ 2.0%。本法仅需一次荧光标记,操作简单、快速灵敏,12 min 内完成一个分析周期,适于测定肌腱和细胞样品。

关键词 羟脯氨酸,激光诱导荧光检测,毛细管电泳,肌腱,细胞

1 引言

组织工程技术是肌腱缺损治疗的一种新途径。在肌腱组织工程研究中,通常需要观察植入的肌腱细胞生长状况和支架材料的降解情况,测定其中胶原蛋白含量的变化可作为考察指标之一^[1]。羟脯氨酸是胶原蛋白的特异性氨基酸,其含量稳定,一般动物性蛋白质不含此种氨基酸。因此,可以通过检测样品中羟脯氨酸的含量变化反映胶原蛋白含量的变化。

目前,测定羟脯氨酸的方法主要有分光光度法^[2]、HPLC^[3]和气质联用法^[4]。毛细管电泳 激光诱导荧光检测 (CE-LIF) 可大大提高测定的灵敏度,从而满足生物样品测定的要求。已有诸多报道采用 LIF-CE 测定氨基酸,并取得满意的分析结果^[5]。而用于测定羟脯氨酸,国外发表的论文只有几篇^[6],国内尚未见报道。本研究采用 FITC 衍生羟脯氨酸,建立 LIF-CE 分析方法,并应用于肌腱细胞和组织化工程肌腱样品的分析,为组织工程研究提供一种灵敏快速的分析手段。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

激光诱导荧光检测 毛细管电泳仪 (自行组装),氩氦激光器发射波长 543 nm,590 nm 波长处采集荧光^[7];pH 精密酸度计 (上海磁仪器厂);101-2ABS 电热鼓风干燥箱 (北京市永光明医疗仪器厂)。石英毛细管柱 (河北永年光导纤维厂)。羟脯氨酸标准品,纯度 >99.0% (Sigma 公司)。20 mmol/L PBS (pH 10.0),5 mmol/L PBS (pH 9.6);1 g/L 羟脯氨酸贮备液:用 5 mmol/L PBS (pH 9.6) 配制。0.25 g/L FITC (北京欣经科生物技术公司);罗丹明 B (北京化工厂)。其它试剂均为分析纯。实验用水为超纯水。

2.2 实验方法

电泳缓冲液为 20 mmol/L PBS (pH 10.0);电泳电压 12 kV,温度 22 °C;电动进样 (15 kV, 10 s),进样端为正极;未涂渍毛细管柱长 60 cm,有效长度 52 cm,内径 100 μm 。新毛细管柱采用 0.1 mol/L NaOH、水冲洗后,运行缓冲液平衡 4h,每次进样前依次用 0.1 mol/L NaOH、水和运行缓冲液各冲洗 2 min。

用 5 mmol/L PBS (pH 9.6) 稀释羟脯氨酸浓度为 0、2、5、10、20、30 及 40 mg/L。分别取标准液和 1 mg/L 罗丹明 B (内标物) 各 5 μL 、一定量 FITC 溶液 (羟脯氨酸浓度 / FITC 浓度为 1/10) 置于塑料离心管中,用 5 mmol/L PBS 定容至 25 μL 。40 \pm 1 °C 水浴避光保温 0.5 h。按上述条件进行毛细管电泳分离,以进样液中羟脯氨酸浓度为横坐标,相对荧光强度比 (FITC 羟脯氨酸相对荧光强度 / 罗丹明 B 相对

2006-02-26 收稿;2006-05-11 接受

本文系国家自然科学基金 (No. 30070678) 和国家教育部博士点基金 (No. 20030610029) 资助课题

荧光强度)为纵坐标绘制校准曲线。

取适量肌腱或细胞样品,加入 10 mol/L NaOH 2 mL, 120 °C 水解 8 h(细胞样品 1.5 h)后,盐酸调节 pH 至中性,水定容至 100 mL,再取适量样液按上述方法进行荧光衍生和毛细管电泳测定。

3 结果与讨论

3.1 样品水解条件的选择

羟脯氨酸在酸碱性环境中均较稳定,因此本实验考察了浓盐酸和 NaOH 的水解效果。浓盐酸水解时,高温下盐酸易挥发将管塞冲出,操作较难控制,对设备有腐蚀。因此选用 NaOH 水解样品。根据文献 [8] 报道,采用 10 mol/L NaOH 水解胶原蛋白。实验考察了水解温度和时间对测定的影响。分别于 100、110 和 120 °C 进行水解,以羟脯氨酸测得值作为考察指标。结果显示,肌腱水解完全分别需 20、12 和 8 h;细胞分别需 5.0、2.5 和 1 h 水解完全。3 个温度下的测定结果无差异。实验采用 10 mol/L NaOH,于 120 °C 肌腱样品水解 10 h,细胞样品水解 1.5 h。

3.2 羟脯氨酸的衍生化反应条件的选择

选择 FITC 作为荧光衍生剂,分别采用了 FITC 的丙酮、硼砂缓冲溶液 (BBS) 和 PBS 对羟脯氨酸进行衍生,然后经毛细管电泳分离测定。

结果表明,以丙酮为 FITC 溶剂得到的羟脯氨酸衍生物峰高明显低于以 BBS 和 PBS 作为溶剂时的峰高,可能是因为进样液中的丙酮影响了进样电流,造成进样量减少。另外,丙酮易挥发,导致测定的不稳定。因电泳运行缓冲液为 PBS,本实验在衍生时选择 PBS 缓冲液为衍生化介质,并考察了衍生介质的浓度、pH 值、衍生时间和温度及 FITC 的用量对衍生的影响,结果见表 1。

表 1 衍生反应介质条件的选择实验

Table 1 Selection of condition for derivation

实验内容 Content of experiment	实验范围 Experimental range	最佳实验条件 Optimum condition
衍生介质的浓度 (mmol/L) Concentration of derivation buffer	2 ~ 20	5
衍生介质的 pH 值 pH of derivation buffer	8.5 ~ 10	9.6
衍生温度 (°C) Derivation temperature	20 ~ 50	40
衍生时间 (min) Derivation time	5 ~ 40	30
FITC 质量浓度 / 羟脯氨酸质量浓度比 Ratio of concentration for fluorescein isothiocyanat (FITC) to hydroxyproline	2.5 ~ 30	10

3.3 电泳缓冲液及其 pH 的选择

实验考察了 PBS 和 BBS 为运行缓冲液时的分离效能。结果表明,当 pH < 10.0 时,在两种缓冲液中 FITC 与 FITC 羟脯氨酸的分离度相当;但将 BBS 的 pH 调至 10.0 后,电泳电流超出仪器工作范围;而在一定 pH 和浓度的 PBS 中可实现衍生物的基线分离。因此,本实验采用 PBS 作为电泳缓冲液。

羟脯氨酸属两性电解质,在不同 pH 的电泳缓冲溶液中具有不同的荷质比和电荷密度,从而影响 FITC 羟脯氨酸的迁移。在电泳缓冲液 pH 7.0 ~ 11.0 范围内考察其对分离的影响。结果显示,随着 pH 的增大, FITC 羟脯氨酸电泳峰形变锐,迁移时间延长, FITC 与 FITC 羟脯氨酸的分离度增大。但 pH 达到 10.0 后,电泳电流升高,焦耳热增加, FITC 羟脯氨酸电泳峰形变宽,分离度变差,且 FITC 羟脯氨酸相对荧光强度下降。其原因可能是 FITC 与羟脯氨酸的衍生反应适宜 pH 值为 8.5 ~ 10.0,过高的 pH 可能会造成衍生物的分解。本实验选择 pH 10.0 的电泳缓冲液。

3.4 电泳缓冲浓度和电泳电压的选择

固定其它实验条件,改变 PBS 浓度 5 ~ 25 mmol/L 进行毛细管电泳测定。随着 PBS 浓度的增加,羟脯氨酸和游离 FITC 的峰形变锐,分离度增大,但当浓度达 25 mmol/L,羟脯氨酸的峰形展宽,两者分离度降低。本实验采用 PBS 的浓度为 20 mmol/L。

固定其它条件,在 8 ~ 16 kV 改变电泳电压,考察 FITC 和 FITC 羟脯氨酸的分离情况。结果表明,增大电泳电压, FITC 羟脯氨酸的迁移时间不断缩短,峰形变锐;但当电压高于 15 kV 时, FITC 与 FITC 羟脯氨酸电泳峰重叠。本实验采用 12 kV 作为分离电压。

3.5 内标物的选择

用罗丹明 B 和 Kiton 红 (Kiton red) 作为内标物进行实验。罗丹明 B 与待测物和样品干扰组分获得了良好的分离,而 Kiton 红与样品干扰组分不能分离。因而,实验选择罗丹明 B 作为内标物。

3.6 干扰实验

实验考察了 19 种常见氨基酸 (L-谷氨酸、丙氨酸、丝氨酸、苯丙氨酸、亮氨酸、精氨酸、脯氨酸、组氨酸、缬氨酸、天冬氨酸、甘氨酸、赖氨酸、异亮氨酸、胱氨酸、甲硫氨酸、酪氨酸、色氨酸、苏氨酸、蛋氨酸) 对测定的影响,结果表明,19 种氨基酸 (皆为羟脯氨酸含量的 5 倍) 均不干扰羟脯氨酸的测定。在胶原蛋白中含量较高的甘氨酸、丙氨酸及脯氨酸可与之完全分离。

3.7 方法检出限、线性范围和精密度

配制浓度为 $0.5 \mu\text{g/L} \sim 8 \times 10^3 \mu\text{g/L}$ 羟脯氨酸标准溶液,按优化条件进行测定,羟脯氨酸在上述范围内呈良好的线性关系,其线性回归方程为 $y = 0.5185x + 0.0491$, $r = 0.9969$ 。以 3 倍基线噪声对应的浓度计算方法检出限为 $0.5 \mu\text{g/L}$ 。

在选定条件下,对同一标准溶液连续测定 8 次,相对迁移时间 (FIC 羟脯氨酸迁移时间/罗丹明 B 迁移时间) 和相对荧光强度比的 RSD 分别为 5.0% 和 6.1%。

3.8 加标回收实验和方法对比实验

分别取适量的肌腱和细胞样品,加入不同水平的羟脯氨酸标准溶液,按上述方法测定羟脯氨酸含量,计算其平均加标回收率在 95% ~ 110%。结果见表 2。

目前羟脯氨酸的测定尚无国家标准方法。本研究室建立了肌腱中胶原蛋白的高效液相色谱法^[9],用此法和毛细管电泳法对同一肌腱样品测定,两者测定结果的相对误差在 -1.9% ~ 2.0% (表 3)。

表 2 样品加标回收率 ($n=3$)

Table 2 Recoveries of standard addition ($n=3$)

样品 Sample	本底值 Background (mg)	加入量 Added (mg)	测得值 Detected (mg)	平均回收率 Average recovery (%)
肌腱 Tendon	0.90	0.50	1.43	106.0
	0.92	1.00	1.90	98.0
	0.95	1.50	2.51	104.0
细胞 Cell	0.25	0.10	0.36	110.0
	0.22	0.20	0.41	95.0
	0.24	0.50	0.76	104.0

表 3 方法对照实验 ($n=3$)

Table 3 Comparison of the determination between high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis ($n=3$)

样品 Sample	高效液相色谱法 HPLC (mg/g)	毛细管电泳法 CE (mg/g)	相对误差 Relative error (%)
1	95.9	94.1	-1.9
2	96.0	94.4	-1.7
3	92.4	94.3	2.1
4	78.9	80.4	1.9
5	71.8	70.8	-1.4

3.9 样品的测定

用本法测定了 60 份组织化工程肌腱样品,植入前肌腱羟脯氨酸含量平均值为 95.5 mg/g,植入 1 星期后取出测定为 90.7 mg/g,3 星期后为 88.2 mg/g,5 星期后为 85.1 mg/g,8 星期后为 80.8 mg/g。结果表明,随植入时间延长,肌腱中羟脯氨酸含量有所下降,说明植入体内后肌腱有一定程度的降解。在肌腱的缺失修复中,可植入体外构建的组织工程化肌腱,刺激自身肌腱或成纤维细胞分泌合成胶原蛋白,从而在体内合成新腱。与此同时,要求植入的肌腱须降解消失。因此,结果提示该组织化工程肌腱可能作为组织工程研究中的植入材料。

测定了 9 份肌腱细胞样品 (新生小鸡屈趾肌腱细胞),对照组 (静态构建细胞) 细胞分泌的羟脯氨酸为 2.33%; 实验组 (动态构建细胞,牵张应力幅度为 10%,频率 0.02 Hz,每小时作用时间 15 min) 为 5.35%。数据经 SPSS10.0 软件包处理,采用多样本均数方差分析, $P < 0.01$,有显著性差异,表明实验组较对照组羟脯氨酸含量有增高。实验结果与肌腱细胞计数一致,实验组细胞数为 32×10^4 个,而对照组细胞数为 22×10^4 个,用多样本均数方差分析, $P < 0.01$,表明实验组较对照组细胞数有增高。

图 1 为羟脯氨酸标准、肌腱和肌腱细胞的毛细管电泳图谱。由图可见,通过条件优化,羟脯氨酸与样品中的其它杂质能较好地分离。

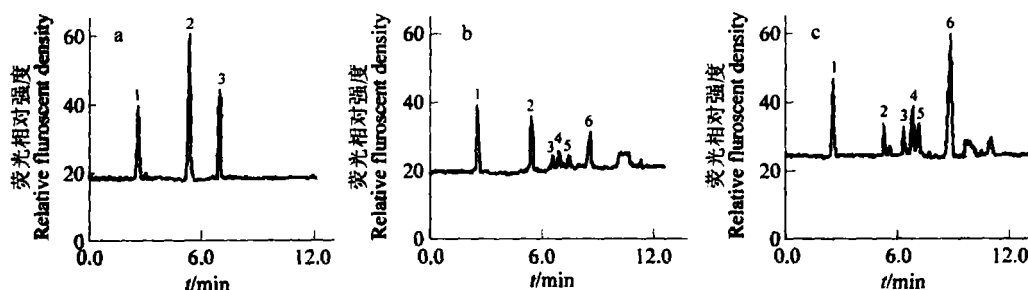


图 1 羟脯氨酸标准 (a)、细胞样品 (b) 和肌腱样品 (c) 的毛细管电泳图

Fig 1 The electropherogram of hydroxyproline standard solution (a), cell (b) and tendon (c)

1. 罗丹明 B (Rhodamine B); 2. 异硫氰酸荧光素 (FITC); 3. FITC-羟脯氨酸 (FITC-proline); 4. FITC-脯氨酸 (FITC-hydroxyproline); 5. FITC-丙氨酸 (FITC-alanine); 6. FITC-甘氨酸等 (FITC-glycine etc.).

References

- 1 Cao Dejun (曹德君), Cao Yilin (曹谊林), Liu Wei (刘伟). *Chinese Journal of Biomedical Engineering and Clinical Medicine* (生物医学工程与临床), **2002**, 6(3): 166 ~ 169
- 2 Kakinuma M, Watanabe Y, Hori Y, Ohri T, Tsuboi R. *J. Chromatogr B*, **2005**, 824: 161 ~ 165
- 3 Delport M, Maas S, van der Merwe SW, Laurens J B. *J. Chromatogr B*, **2004**, 804: 345 ~ 351
- 4 Arlt K, Brandt S, Kehr J. *J. Chromatogr A*, **2001**, 926: 319 ~ 325
- 5 Yong M L, Ying Q, Vandebussche E, Vandesande F. *Journal of Neuroscience Methods*, **2001**, 105: 211 ~ 215
- 6 Dugan M E R, Thacker R D, Aalhus J L, Jeremiah L E, Lien K A. *J. Chromatogr B*, **2000**, 744: 195 ~ 199
- 7 Li Yuanqian (黎源倩), Yang Jingguo (杨经国), Zhou Yin (周颖), Zou Xiaoli (邹晓莉), Mi Jianping (米建平), Zeng Hongyan (曾红燕). *Chinese Journal of Sichuan University (Medical Science Edition)* (四川大学学报(医学版)), **2004**, 35(1): 103 ~ 106
- 8 Li Qiuying (李秋营), Yao Rulin (姚汝琳). *Chinese Journal of Shanxi Medical University* (山西医科大学学报), **2001**, 32(6): 558 ~ 559
- 9 Zou Xiaoli (邹晓莉), Li Yuanqian (黎源倩), Zeng Hongyan (曾红燕), Zhou Jian (周健), Qin Tingwu (秦廷武), Mo Xiangtao (莫湘涛). *Chinese Journal of Chromatography* (色谱), **2006**, 24(3): 263 ~ 266

Determination of Hydroxyproline in Tendon and Cell by Laser Induced Fluorescence-Capillary Electrophoresis

Zou Xiaoli, Zhou Chunyan, Li Yuanqian*, Zeng Hongyan

(Department of Sanitary Technology, West China School of Public Health, Sichuan University, Chengdu 610041)

Abstract The methods for analysis of hydroxyproline by capillary electrophoresis (CE) with laser induced fluorescence (LIF) were developed. The collagen in tendons and cells can be decomposed to amino acid and derivatized with fluorescein isothiocyanate (FITC). The content of its special amino acid hydroxyproline was determined by LIF-CE method. The linear range was $0.5 - 8 \times 10^3 \mu\text{g/L}$ and the detection limit of the method was $0.5 \mu\text{g/L}$. The RSD for relative migration time and relative fluorescence intensity ratio were 5.0% and 6.1%. The proposed method was used in analysis of 60 tendons and 9 cells sample to study the decomposition of tendons and the change of cells growth after culture. The average recoveries were 95% - 110%. And compared with high performance liquid chromatography method, the relative error of determination results between the two methods was -1.9% - 2.0%. Only one fluorescent labeling was needed. One analysis can be completed within 12 min. This method was available for determination of hydroxyproline content in tendons and cells.

Keywords Hydroxyproline, laser induced fluorescence, capillary electrophoresis, tendon, cell

(Received 26 February 2006; accepted 11 May 2006)