DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.12.048
第23卷第12期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 12
2001年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2001

文章编号:1000-5404(2001)12-1485-02

技术方法

胶原蛋白特异性氨基酸测定方法的改进

Improved method for measurement of specific amino acids of collagen

孙 玮,潘 峰,张正治,苟 俊 (第三军医大学高原军事医学系中心实验室,重庆 400038)

提 要:目的 建立一种快速、准确、可靠的胶原蛋白定量检测方法。方法 采用6300黄金系统氨基酸分析仪,在钠柱90 min程序蛋白质水解分析方法基础上,根据羟脯氨酸(HYP)和羟赖氨酸(HYL)的特性,分别建立了HYP和HYL的快速测定方法,并用此方法检测了大白兔尺骨中段骨缺损处再生组织内HYP和HYL的含量。结果 用此方法完成HYP和HYL分析的时间均为18 min,比原方法缩短了72 min,且有较好的重现性(HYP *CV*:日内0.89%,日间1.28%;HYL *CV*:日内2.66%,日间3.48%)、回收率高(HYP:97.5%;HYL:96.09%)。结论 本方法是一种快速、准确、可靠的胶原蛋白定量检测方法,并利于大批量样品的快速测定。

传统测定胶原特异性氨基酸含量和胶原蛋白总量的方法是化学比色法和电泳法,其操作步骤繁琐,影响因素多,样品需要量大,且准确性差。气相色谱法虽灵敏度高[1],但样品的衍生操作复杂。目前多采用高效液相色谱法[2,3]和氨基酸自动分析法。氨基酸分析仪虽可提供准确、高灵敏度的测定方法[4],但常规的蛋白水解液分析方法耗时太长(90 min),因此不利于大批量样品的快速分析以及临床监测,本实验介绍了应用6300黄金系统氨基酸分析仪快速测定羟脯氨酸(HYP)和羟赖氨酸(HYL)含量的方法。

1 材料与方法

1.1 试剂

羟脯氨酸,分析纯,上海生化试剂厂;羟赖氨酸,光谱纯,瑞士Fluka公司;枸橼酸钠缓冲液按其pH值不同分为枸橼酸钠缓冲液-A(Na-A)、枸橼酸钠缓冲液-D(Na-D),NaOH为主要成分的再生液NaOH-R(Na-R),枸橼酸钠稀释液-S(Na-S),均为美国Beckman公司生产;茚三酮,分析纯,上海生物制品研究所;二甲亚砜,分析纯,江苏正兴化工研究所;盐酸,优级纯,上海生化试剂厂;实验用水为超纯水。

1.2 仪器

Beckman公司生产的6300黄金系统高效氨基酸分析仪;601黄金系统色谱工作站;国产烤箱、水浴锅等。

1.3 组织标本的处理

选用日本大耳白兔左尺骨中上段骨缺损内再生组织进行分析。准确称取该标本1.0~5.0 mg于水解管内,加入5 ml 6 mol/L HCl,充氮气2 min,抽真空封管,置于烤箱内,(110±1)℃水解22~24 h,将水解液置于100 ℃水浴锅上使盐酸充分挥发,加超纯水洗涤3次,蒸干,用Na-S稀释液定容至2 ml,再用0.22 μm微孔滤膜过滤,滤液备用。

1.4 色谱条件

Beckman公司氨基酸分析色谱柱(钠柱,12 cm×4.0 mm);流动相,Na-A(用于分析HYP),Na-D(用于分析HYL),Na-R(再生液),流速14 ml/h;茚三酮显色剂,将二甲亚砜与茚三酮配制成茚三酮显色剂,流速6 ml/h;柱温,48 ℃,77 ℃;进样量,50 μl/次;比色波长,570 nm,440 nm。

1.5 标准曲线

准确称取HYP和HYL标准,用Na-S稀释,使之成为1 mg/ml的标准储备液,将HYP、HYL储备液分别稀释成0.2、0.5、1、2.5、5、10 μg/ml浓度,进样,每个浓度进二针,作出标准曲线(线性范围0.2~10.0 μg/ml)。

1.6 程序改进,见表1

表1 原程序与短程序的对照

步骤	原程序	短程序HYP	短程序HYL
切换Na-A时间	79.0 min	13.0 min	——
切换Na-B时间	31.0 min	——	——
切换Na-D时间	46.0 min	——	13.0 min
切换Na-R时间	77.0 min	12.0 min	11.0 min
温度1(T1℃)	48.0 ℃	48 ℃	
切换温度2时间	14.0 min	——	——
温度2(T2℃)	75 ℃	——	——
切换温度1时间	59.0 min	——	11.0 min
温度3(T3℃)	77 ℃	——	77 ℃
切换茚三酮时间	83.0 min	16.0 min	16.0 min
切换水的时间	76.0 min	11.0 min	10.0 min
进样的时间	89.0 min	17.0 min	17.0 min
分析总时间	90.0 min	18.0 min	18.0 min
流 速	20.0 ml/h	20.0 ml/h	20.0 ml/h

2 结果

2.1 HYP和HYL的分析色谱图,见图1、2

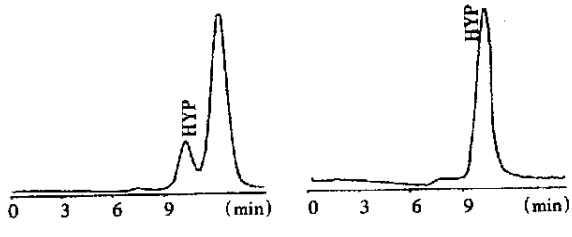


图1 本方法对样品(A)和标准(B)HYP的分析图谱

作者简介:孙 玮(1966—),女,云南省陆良县人,实验师,主要从事分析测试方面的研究,发表论文18篇。电话:(023)68752352

收稿日期:2000-10-27;修回日期:2001-01-04

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

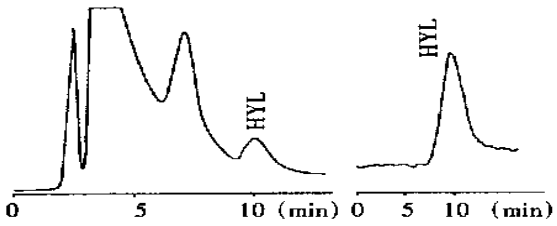


图 2 本方法对样品(A)和标准(B)HYL 的分析图谱

2.2 HYP、HYL 的回收率

将一定量的 HYP 和 HYL 标准液分别加入 8 份样品中, 用同样的方法测定, HYP 和 HYL 的回收率结果见表 2。

表 2 HYP、HYL 的回收率

加入量(μg)	HYP		HYL	
	测得量(μg)	回收率(%)	测得量(μg)	回收率(%)
2	2.01	100.50	1.93	96.50
2	1.97	98.50	1.95	95.00
2	1.98	99.50	2.03	101.50
2	1.93	96.50	1.97	98.00
4	3.85	96.25	3.65	91.25
4	3.82	95.50	4.05	94.00
4	3.89	96.25	3.87	95.00
4	3.85	96.25	3.90	97.50
平均		97.53		96.09

2.3 HYP、HYL 的重现性

取同一份标本, 日内和日间各进样 8 次, 测得 HYP、HYL 重现性结果见表 3。

表 3 HYP、HYL 重现性试验($n=8$)

化合物	日内		日间	
	测得值	CV(%)	测得值	CV(%)
HYP	30.34±0.27	0.89	40.67±0.52	1.28
HYL	6.39±0.17	2.66	6.03±0.21	3.48

3 讨论

氨基酸分析仪分析氨基酸主要是通过强酸性阳离子交换树脂对氨基的吸附、洗脱、分离来完成的。在氨基酸分析中柱床高度、柱温、洗脱剂的 pH 值和离子强度等对峰的保留值和分辨率有一定影响, 本实验中所用色谱柱为 Beckman 公司生产的不锈钢专用柱, 柱长无法随意改变, 因此本实验采用了改变其他几个因素来提高分析速度和分辨率。HYP 为酸性氨基酸, 比较容易被洗脱, 所以我们采用了 pH 值和离子强度相对较低的洗脱剂 Na-A(pH 3.15)和较低的柱温(48 ℃)进行分析, HYP 一经洗脱, 立即用高 pH 的再生液再生柱子, 将其余氨基酸从柱上洗脱下来, 再用 Na-A 平衡分离柱, 以便进入下一次分析。HYL 为碱性氨基酸, 与树脂结合力强, 较难洗脱, 因此采用了较高的柱温 77 ℃和高 pH 高离子强度的洗脱剂 Na-D(pH 4.25), 它使酸性, 中性氨基酸很快被洗脱下来, 并堆积在一起, 见图 2, 而 HYL 则能得较好的分辨率和较快的分析速度, 当 HYL 出峰之后, 立即用再生液清洗再生分离柱, 然后用 Na-D 缓冲液平衡分离柱, 继续分析下一个样品。根据上述原理建立的胶原特异性氨基酸的快速测定法, 缩短了分析时间, 重现性好, 变异系数小, 回收率高, 测定结果准确可靠, 且操作简便, 是胶原特异性氨基酸测定、胶原含量估算的理想方法, 可广泛应用于各种胶原样品的 HYP 和 HYL 分析。

关键词: 胶原; 羟脯氨酸(HYP); 羟赖氨酸(HYL); 氨基酸分析仪; 快速测定
中图法分类号: Q517 文献标识码: B

参考文献:

[1] Euli D, Colombo L, Bruno A, *et al*. Assay for 5-hydoxylysine and L-lysine in human and rat urine and in bone by gas chromatography[J]. J Chromatogr B Biomed Sci Appl, 1999, 724(2): 373—379.
[2] Bank R A, Beekman B, Tenni R, *et al*. Pre-column derivatisation method for the measurement of glycosylated hydroxylysines of collagenous proteins [J]. J Chromatogr B Biomed Sci Appl, 1997, 703(1—2): 267—272.
[3] Kondo A, Ishikawa O, Okada K, *et al*. Measurement of histidinohydroxylysinonorleucine and hydroxyproline in skin collagen by reversed-phase high-performance liquid chromatography after 9-fluorenylmethyl chloroformate labeling[J]. Anal Biochem, 1997, 252(2): 255—259.
[4] Jacques L B, Christelle G, Colette C L, *et al*. Amino acid determination in biological fluids by automated ion-exchange chromatography: performance of HitachiL-8500A[J]. Clinical Chemistry, 1997, 43(8): 1 421—1 428.

(编辑 潘式文)

文章编号: 1000-5404(2001)12-1486-02

技术方法

约氏疟原虫合子的分离和动合子培养

Isolation of *Plasmodium yoelii* zygotes and its ookinetes cultivation *in vitro*

郝宏兴[1], 苟 俊[2], 张静茹[1], 段建华[1] (第三军医大学: [1]基础医学部病原生物学教研室; [2]高原军事医学系中心实验室; 重庆 400038)

提 要: 目的 从感染小鼠血液直接分离约氏疟原虫合子, 并在体外培养, 转化为动合子。方法 体外诱导感染鼠血中的约氏疟原虫雌雄配子形成、受精, 采用 Ficoll 400-Hypaque 密度梯度离心法分离合子, 并在 MEM 培养基中培养。结果 从 10~15 只感染小鼠血液可分离到 10^6 数量级的约氏疟原虫合子; 在 22 ℃条件下, 经 18~24 h 培养有动合子形成。结论 可以直接从感染血中分离到约氏疟原虫合子, 所得合子经培养可形成动合子。

作者简介: 郝宏兴(1967—), 男, 山西省平定县人, 博士研究生, 讲师, 主要从事疟疾方面的研究, 发表论文 5 篇。电话: (023)68752243
收稿日期: 2001-01-21; 修回日期: 2001-05-19

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net