

毛细管电泳-激光诱导荧光检测大鼠脑组织多巴胺含量

刘广印, 沈佐君, 何晓东, 伊茂礼

[摘要]目的: 采用毛细管电泳-激光诱导荧光法建立检测大鼠脑组织多巴胺含量的方法。方法: 低温匀浆大鼠脑组织离心后, 取上清用 pH 11.0 10 mmol/L 硼砂缓冲液, 在室温下衍生反应 10 h 连接上 FITC 荧光基团; 毛细管电泳分离条件为 pH 10.3 100 mmol/L 硼酸-Tris 缓冲液。结果: 在选定的实验条件下, 方法检测限 (S/N=3) 达 2.1 nmol/L 水平, 批内相对标准差 (RSD) 为 3.4%, 回收率达 96.05%, 在 10^{-8} ~ 10^{-10} mol/L 范围内呈良好线性关系。结论: 应用毛细管电泳-激光诱导荧光法可检测大鼠脑组织多巴胺含量。

[关键词] 帕金森病; 多巴胺; 电泳; 毛细管; 激光诱导荧光; 大鼠

[中国图书资料分类法分类号] R 742.5 R 971.93 [文献标识码] A

Determination of dopamine in the brain tissue of rats by using capillary electrophoresis with laser induced fluorescence method

LIU Guangyin SHEN Zuojun HE Xiaodong YIM aoli

(Anhui Provincial Center for Clinical Laboratory, Anhui Provincial Hospital, Anhui Medical University, Hefei 230001, China)

[Abstract] **Objective** To establish a method of determining the dopamine in the brain tissue of rats by using capillary electrophoresis with laser induced fluorescence. **Methods** The homogenate of the rats' brain tissue was centrifuged in low temperature and the supernatant was reacted in pH 11.0 10 mmol/L borax buffer solution. The reaction of derivatization time was 10 hours under alkaline (10 mmol/L $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ pH 11.0); mobile condition of capillary electrophoretic separation was a mixture of 100 mmol/L Boric acid-Tris. **Results** Detection limits of the method were determined to be lower than 2.1 nmol/L and the RSD values were 3.4%; the recoveries were above 95.6%. The linearity was from 10^{-10} to 10^{-8} mol/L. **Conclusion** The method of detecting dopamine in the brain of rats is convenient by using capillary electrophoresis with laser induced fluorescence.

[Key words] Parkinson disease; dopamine; electrophoresis; capillary; laser induced fluorescence; rats

多巴胺 (dopamine, DA) 属儿茶酚胺类, 为单胺类神经递质。DA 主要集中在锥体外系, 定量分析其含量对于神经系统疾病尤其是帕金森病的临床研究有重要的意义^[1]。单胺类神经递质的测定方法主要有高效液相色谱法 (HPLC)、电化学分析法和毛细管电泳法。HPLC 是研究细胞外液中某些递质类氨基酸的主要手段, 但因进样量较大, HPLC 无法与微透析取样技术 (1~2 $\mu\text{L}/\text{min}$) 联用以实现神经递质在某些重要生理及病理过程中的动态监测。此外, 荧光检测的灵敏度较低, 无法满足细胞外液中某些超痕量神经递质检测的需求; 电化学检测虽然具有较高的灵敏度, 但重现性差及大量其它有电响应物质的干扰是影响其应用的主要问题。毛细管电泳-激光诱导荧光 (CE-LIF) 方法具有进样量小、高效和灵敏度高的特点, 与微透析技术结合可对痕

量活性物质进行定量检测。本实验采用毛细管电泳-激光诱导法检测大鼠脑组织多巴胺含量, 并探讨该方法的最佳条件。

1 材料与方 法

1.1 动物及分组 Spague-Dawley (SD) 大鼠 20 只由安徽医科大学动物实验中心提供 (皖动 2003001), 雄性, 体重 (250 \pm 10) g 适应性喂养 1 周后, 随机分为帕金森病组和对照组。帕金森病组采用立体定向技术定量注射一侧 SNc (黑质致密部) 10 μL 2 周后阿扑吗啡腹腔注射 (0.5 mg/kg); 对照组用 0.1 mmol/L PBS 10 μL 同法处理。

1.2 仪器与试剂 仪器为 BECKMAN PACE™ 毛细管电泳仪; 488 nm 氩离子激光器 (美国 Beckman-Coulter 公司); 毛细管 (内径为 50 μm , 河北永年光导纤维厂); 超纯水制备仪 (瑞士, Birstead)。DA 标准品 (Sigma), FITC (Sigma), 四硼酸钠、硼酸、Tris 丙酮 (上海化工一厂), 实验用水均为超纯水制备仪产生。实验中所有数据采集和计算用 32Karat software V4.0 软件 (美国 Beckman-Coulter)。

1.3 实验方法

1.3.1 鼠脑组织匀浆样品的制备 大鼠快速断头取脑, 去除小脑、额叶、皮质及脑干, 准确称重。以

[收稿日期] 2006-08-29

[基金项目] 安徽省自然科学基金资助项目 (050430902)

[作者单位] 安徽省立医院 临床检验中心, 安徽 合肥 230001

[作者简介] 刘广印 (1965-), 男, 硕士, 主要从事毛细管电泳-激光诱导荧光的研究 (现工作于安徽省亳州市人民医院中心实验室, 236800)。

[通讯作者] 沈佐君, Tel: 0551-2283742 E-mail: shenzuojun@163.com

1 g :10 ml 加入 0.1 mmol/L 高氯酸, 手动冰浴匀浆, 待组织成细胞悬液后, 立即以 $12\ 000\times g$ $4\ ^\circ\text{C}$ 低温离心 10 min. 离心后取部分上清液测定, 其余上清液分装后置 $-40\ ^\circ\text{C}$ 冰箱冻存待用, 每个冷冻标本检测前只能复苏 1 次^[2].

1.3.2 衍生化条件的优化 本文选用 FITC 作为衍生化试剂, 分析了有关衍生缓冲液 pH 和浓度、衍生时间、FITC 浓度等因素的影响。(1) pH 值对 DA 衍生化的影响: 取 10 mmol/L 硼砂缓冲液, 用 1.0 mol/L NaOH 和 1.0 mol/L HCl 分别调节此溶液的 pH 为 6.0, 8.0, 9.0, 9.5, 10.0, 10.5, 11.0, 12.0. 各取 $80\ \mu\text{l}$ 然后分别加入 $1\ \mu\text{mol/L}$ DA $10\ \mu\text{l}$ 和 $1\ \mu\text{mol/L}$ FITC $1\ \mu\text{l}$ 振荡器混匀, 室温避光反应 10 h. 反应液用去离子水稀释 50 倍后上样毛细管电泳检测 (见图 1). 由图可知, 在 pH 11.0 时 DA 与 FITC 反应的衍生物有最大的荧光强度。(2) 硼砂缓

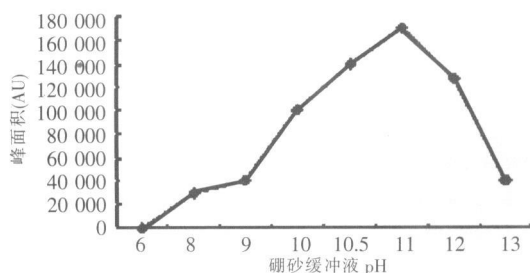


图 1 不同硼砂缓冲液 pH 值对 DA 峰面积的影响

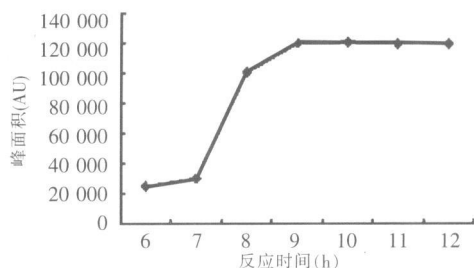


图 3 pH 11.0 硼砂缓冲液不同反应时间对 DA 峰面积的影响

1.4 电泳 实验采用 $50\ \mu\text{m}$ 未包被新毛细管, 第 1 次使用前先用 1 mol/L NaOH 冲洗 30 min, 接着用 0.1 mol/L NaOH 冲洗 20 min, 最后用超纯水冲洗 30 min. 实验时毛细管分别用 0.1 mol/L NaOH、水和 100 mmol/L 硼酸-Tris 溶液, pH 10.3 电泳缓冲液各冲洗 5 min, 1.0 psi 压力进样 10 s 然后加 20 kV 电压分离 30 min, 每个样品检测间隔用 0.1 mol/L 氢氧化钠和水各冲洗 3 min.

1.4.1 标准曲线的制作 取 0.5 ml 离心管 9 支, 分别依次编号, 各加 10 mmol/L pH 11.0 硼砂缓冲液 $80\ \mu\text{l}$ 然后依次加入 2.0, 1.0, 0.8, 0.6, 0.4, 0.2, 0.1, 0.05, 0.01 $\mu\text{mol/L}$ DA 标准液 $10\ \mu\text{l}$ 最后各加 $1\ \mu\text{mol/L}$ FITC $1\ \mu\text{l}$ 震荡混匀, 室温避光反应 10 h 后稀释 50 倍上样检测. 以 DA 峰面积为纵坐标,

缓冲液浓度对衍生化反应的影响: 分别配制 5.0, 10.0, 20.0, 40.0, 60.0 mmol/L 5 种不同浓度的硼砂缓冲液, 用 1 mol/L NaOH 或 HCl 调节 pH 至 11.0 然后分别以此不同浓度的硼砂缓冲液作为反应介质, 其余操作同前. 以硼砂缓冲液浓度对峰面积作图 (见图 2). 由图可知, 缓冲液以 10 mmol/L 最佳。(3) 反应时间与衍生化的关系: 在 0.5 ml 离心管中分别加入 10 mmol/L pH 11.0 硼砂缓冲液 $80\ \mu\text{l}$ $1\ \mu\text{mol/L}$ DA $10\ \mu\text{l}$ $1\ \mu\text{mol/L}$ FITC $1\ \mu\text{l}$ 混匀, 于 5 h 后, 每隔 1 h 上样检测 1 次, 至 12 h. 以峰面积对反应时间作图 (见图 3). 由图可以看出, 反应 10 h 后, 趋于平衡状态。(4) FITC 浓度对衍生化反应的影响: 分别配制 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 $\mu\text{mol/L}$ 的 FITC 操作同 (1). 以 FITC 浓度对峰面积作图 (见图 4). 可见 FITC 在 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 反应完全. 为使反应充分, 本实验采用 $1.0\ \mu\text{mol/L}$ FITC.

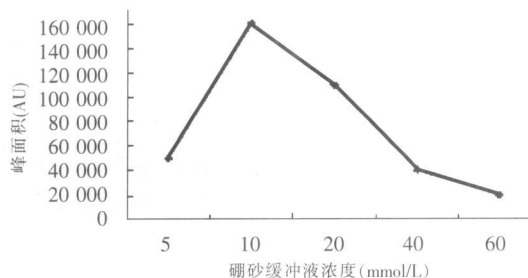


图 2 不同硼砂缓冲液浓度对 DA 峰面积的影响

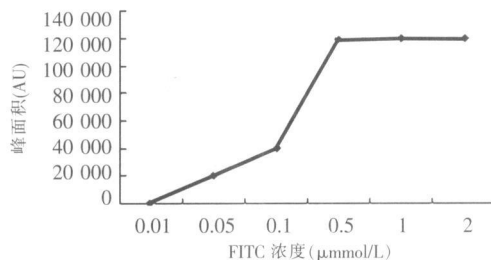


图 4 不同 FITC 浓度对 DA 峰面积的影响

DA 浓度为横坐标, 绘图即得标准曲线 (见图 5).

1.4.2 标本检测 取 0.5 ml 离心管, 加 10 mmol/L pH 11.0 硼砂缓冲液 $80\ \mu\text{l}$ 再加入脑匀浆液 $10\ \mu\text{l}$ 对照管加入 0.1 mol/L HCl $10\ \mu\text{l}$ 最后各加入 $1\ \mu\text{mol/L}$ FITC $1\ \mu\text{l}$ 震荡混匀, 室温避光反应 10 h 后, 上样检测. 谱峰采用标溶加入法鉴定, 定量分析由标准工作曲线法实现.

1.5 统计学方法 采用 *t* 检验和直线回归与相关分析.

2 结果

2.1 空白电泳、标准液电泳和脑匀浆液电泳 见图 6.

2.2 样品测定结果 对照组 DA 含量高于帕金森

病大鼠组 ($P < 0.001$) (见表 1)。

表 1 实验组和对照组 DA 含量 ($n_i = 10 \mu\text{mol/L}$)

分组	DA 值 ($\bar{x} \pm s$)	t	P
对照组	0.22 ± 0.032	7.12	< 0.001
帕金森病大鼠组	0.13 ± 0.024		

2.3 线性范围 DA 在 10 ~ 1000 nmol/L 浓度范围内线性关系良好, 回归方程为 $\hat{Y} = 359.492 - 6X + 2.9297$, $r^2 = 0.9858$ 。

2.4 回收率实验、日内重复性实验和检测限 回收率为 96.05%, 批内相对标准差 (RSD) 为 3.4%, 由基线噪音宽度计算相应于信噪比为 3 (S/N=3) 时的浓度即

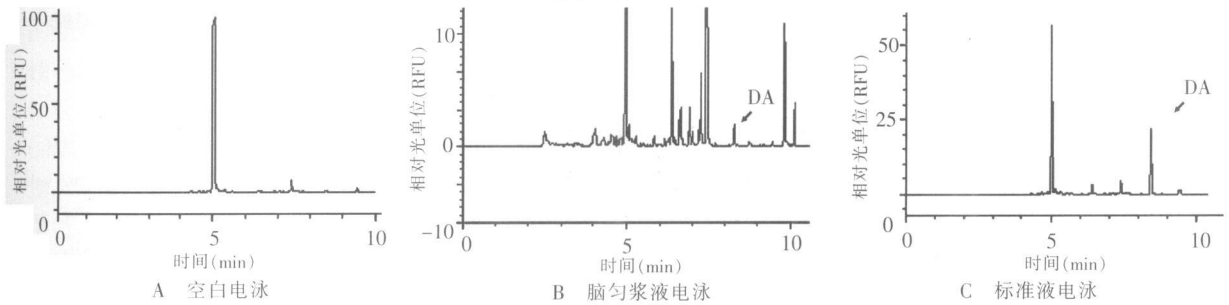


图 6 空白电泳、脑匀浆液电泳和标准液电泳

3 讨论

毛细管电泳是采用毛细管替代平板凝胶, 使分离效率明显提高^[3]。与 HPLC 相比, 它具有高效、快速、微量、分离模式多等优点, 毛细管电泳-激光诱导荧光 (CE-LIF) 以其进样量小 (1 次检测仅需数 nl 或 μl)、高效和灵敏度高等特点, 与微透析技术结合可动态研究痕量活性物质在某些重要生理及病理过程变化, 从而了解它们确切的生理病理功能。目前, CE-LIF 已用于鼠脑微透析液中谷氨酸 (Glu) 和天冬氨酸 (Asp) 含量的检测。本实验根据现有条件采用脑匀浆技术, 严格控制试验条件, 检测鼠脑组织 DA 含量, 也获得较为满意的效果。

递质类氨基酸等生理活性物质在正常的光谱范围内没有生色及吸收基团, 故必须用合适的衍生试剂标记才能进行 CE-LIF 检测^[4,5]。氨基酸测定常用的衍生化试剂有两大类: 紫外和荧光衍生化试剂。紫外法的灵敏度较低, 不能检出脑匀浆液中痕量多巴胺; 荧光法灵敏度较高, 可用于多巴胺的检测。

FITC 与氨基酸及小分子量肽的反应性较高, 最大激发波长 (490 nm) 和氩离子激光器的 488 nm 谱线匹配, FITC 衍生物稳定, 且衍生物具有较高的荧光效率, 非常适合于细胞外液中痕量递质类氨基酸的衍生标记。本实验经优化采用 $1.0 \mu\text{mol/L}$ FITC,

为最低检出限, DA 的最低检出限为 2.1 nmol/L 。

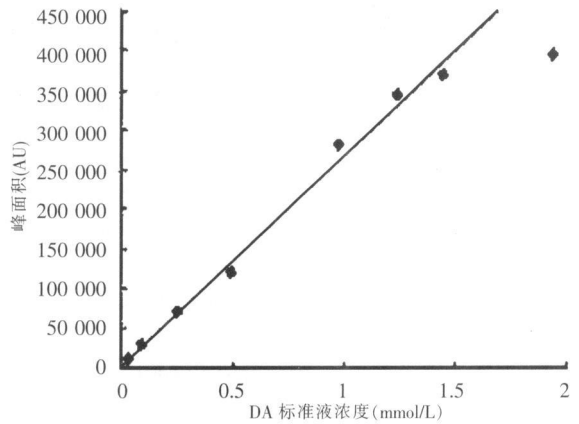


图 5 标准曲线

既保证了 DA 的充分衍生, 又避免了 FITC 浓度过高产生过多杂峰影响定量检测; 衍生缓冲液 pH 和浓度对 DA 的衍生化效率产生影响, 衍生时间必须保证衍生化反应完成; 为获得最佳衍生化效果, 本实验分别对硼砂缓冲液 pH、浓度和衍生时间进行优化, 发现最佳硼砂缓冲液浓度为 10 mmol/L , pH 为 11.0 衍生化反应完成时间为 10 h。在优化实验条件下, 对实验样本检测, 实验结果显示对照组 DA 含量高于帕金森病大鼠组。本实验采用的分离条件是 pH 10.3 100 mmol/L 硼酸-Tris (1:1) 溶液。本研究结果提示, 通过实验优化, CE-LIF 检测鼠脑组织多巴胺含量, 实验结果稳定、可靠, 非常有潜力在科研及临床领域得到广泛应用。

[参 考 文 献]

- [1] 金国章. 脑内多巴胺的生物医学 [M]. 上海: 上海科技教育出版社, 1998: 4-5
- [2] 张雷, 卢英俊, 邓同乐, 等. 高效液相色谱-荧光检测流速梯度法测定去卵巢小鼠脑内单胺类神经递质 [J]. 色谱, 2005, 23 (1): 76-78
- [3] Shuya G, Xingguo G, Zhide H. Identification and determination of ecdysone and phenylpropanoid glucoside and flavonoids in *Lamium maculatum* by capillary zone electrophoresis [J]. *Biomol Chromatogr* 2003, 17 (7): 477-482
- [4] 张东明, 付敏. 胶束电动毛细管色谱-半导体激光诱导荧光测定单胺类神经递质 [J]. 分析科学学报, 2002, 14 (18): 265-268
- [5] 党福全, 陈义, 刘国诠. 鼠脑微透析液中谷胱甘肽和介质氨基酸的 CE-LIF [J]. 化学通报, 1999, 20 (11): 35-37