

# MDQ型毛细管电泳仪分离血清脂蛋白方法学建立与评价\*

王跃国, 王惠民, 张芹, 杨曙梅, 黄一红, 王忠慧

(南通大学附属医院检验医学中心, 江苏南通 226001)

**摘要:**目的 建立毛细管区带电泳分离血清脂蛋白的方法。方法 用75 μm(i. d.)×60 cm(L)未涂层熔融硅毛细管, 含0.001 g/dl Brij35 pH 10.0的硼砂溶液作电泳缓冲液, 分离经NBD-酰基鞘氨醇预染的血清脂蛋白, 激光诱导荧光(LIF)检测。结果 10 min内可将脂蛋白分成3条区带。结论 毛细管区带电泳为血清脂蛋白分析提供了一种新的分析方法。该方法简单、快速、重复性好。

**关键词:**毛细管区带电泳; 血清脂蛋白; NBD-酰基鞘氨醇; Brij35

**中图分类号:** Q503 R446.11<sup>+</sup>2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-7414(2006)01-015-04

## Analysis and Evaluate of Serum Lipoproteins by MDQ Model Capillary Electrophoresis Apparatus

WANG Yue-guo, WANG Hui-min, ZHANG Qin, YANG Shu-mei,

HUANG Yi-hong, WANG Zhong-hui (Laboratory Medical Center of

Affiliated Hospital of Nantong University, Jiangsu Nantong 226001, China)

**Abstract: Objective** To establish a method of serum lipoproteins by capillary zone electrophoresis. **Methods** The separation of pre-stained lipoproteins by NBD-ceramide was demonstrated in fused-silica capillaries with laser-induced fluorescence detector. The separation was accomplished using borax buffer (pH 10.0) with 0.001 g/dl Brij35 and the capillary column with 75 μm(i. d.) and 60 cm of total length (50 cm to detector). **Results** Three patterns of lipoproteins eluted within 10 min. **Conclusion** It was a new assay for serum lipoproteins by capillary zone electrophoresis. The method was simple, rapid and reproducible for serum lipoproteins.

**Keywords:** capillary zone electrophoresis; serum lipoproteins; NBD-ceramide; Brij35

脂蛋白的分离方法有超速离心法、电泳法、薄层色谱法和免疫分析等, 前两者常用, 但超速离心方法繁琐、需特殊仪器, 相比较而言电泳法更适合于临床常规工作。电泳法分析脂蛋白从纸电泳开始不断改进, 支持介质从淀粉胶到醋酸纤维膜, 从琼脂糖到聚丙烯酰胺, 各有优缺点。以毛细管作为分离通道, 高压电场为驱动力的毛细管电泳是一种较新的分析方法, 已广泛用于分离小分子、手性分子、核酸、蛋白质甚至单细胞, 柱效高、分离效果好、速度快。国内外均有报道用毛细管电泳分离血清蛋白质<sup>[1,2]</sup>, 在检验领域有广阔的应用前景。因此, 我们建立了用毛细管电泳分离脂蛋白的方法, 并与 Helena 电泳结果作了初步比较。

### 1 材料和方法

**1.1 对象** 本院门诊和住院病人标本, 清晨空腹采血, 37℃水浴 10 min, 3 000 r/min 离心 10 min 分离血清, 测血清胆固醇水平筛选结果正常的标本 40 例。所选血清标本 5 d 内分析完毕。

**1.2 仪器** ①美国 Beckman-Coulter 公司 P/ACE MDQ 毛细管电泳仪, 配置二极管阵列(PDA)和激光诱导荧光(LIF, 激发波长 488 nm, 发射波长 520 nm) 探测器; ②未涂层熔融硅毛细管

(河北永年锐洋色谱器件公司出品), 内径 75 μm, 外径 375 μm, 总长 60 cm, 有效长度(进样端至检测窗口) 50 cm; ③美国 Helena 公司 REP 全自动电泳仪及配套琼脂糖凝胶试剂盒(LIPO Cat. No. 3182), 400V/cm 分离 15 min, 干燥后油红 7B 染色 525 nm 扫描。④pH 计: pH S-3TC(0.01 级), 上海天达仪器公司产。

**1.3 试剂** 苏丹黑 B(Sigma), NBD C<sub>6</sub>-酰基鞘氨醇(Molecular Probes), Triton X-100、NP40(Fluka), Brij35(Koch-Light); Tween20、硼砂、氢氧化钠、盐酸、乙二醇和甲醇均为上海试剂厂。除甲醇为色谱纯, 其它均为分析纯, 实验用水为双蒸水。

### 1.4 方法

**1.4.1 样品处理:** ①苏丹黑 B 标记: 100 μl 血清 + 50 μl 苏丹黑 B(1 g/dl 溶于乙二醇) 4℃ 孵育 1 h, 取 100 μl 预染血清加 500 μl 电泳缓冲液; ② NBD-C<sub>6</sub>-酰基鞘氨醇标记: 10 μl 血清 + 20 μl NBD C<sub>6</sub>-酰基鞘氨醇(0.1 mg/ml, 溶于乙二醇: 甲醇 9:1), 室温孵育 1 min 后加 120 μl 电泳缓冲液。

**1.4.2 进样:** 0.5 psi(1psi=6.89 kPa) 恒压 5 s。

**1.4.3 分离:** 25℃ 恒温, 25 kV 恒压分离 10 min。

**1.4.4 数据:** 32 Karat 7.0 软件系统自动采集、分

\* 基金项目: 江苏省卫生厅重大项目(H200216), 南通市社会发展基金资助课题(2004-S40031)。

作者简介: 王跃国(1967—), 男, 医学学士, 副主任技师, 主要从事毛细管电泳技术研究, 曾获江苏省南通市科技进步奖一等奖, 江苏省卫生厅新技术引进奖二等奖, E-mail: yueguowang@163.com。

析、处理数据。

1.4.5 毛细管处理:0.1 mol/L NaOH、双蒸水、电泳缓冲液依次各冲洗 5 min(20 psi),每一标本电泳后及开机后和关机前均同样处理。

2 结果

2.1 优化实验条件

2.1.1 标记物选择:苏丹黑 B 标记的脂蛋白 570 nm 的电泳图谱如图 1,脂蛋白成分的信号弱,噪音强。改用荧光染料 NBD-C<sub>6</sub> 酰基鞘氨醇预染 LIF 检测进行以下实验。

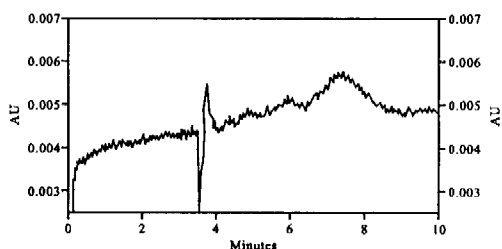


图 1 含 0.001 g/dl Brij35 的 25 mmol/L pH 9.5 硼砂缓冲液 25 kV 恒压毛细管电泳分离图谱

2.1.2 缓冲液的选择:硼砂在碱性条件下稳定,是分离蛋白质常用的缓冲液。其它如 2-氨基-2-甲基-1,3-丙二醇(Ammediol)和 Tris 缓冲液的 pH 缓冲范围分别为 7.8~9.7 和 7.2~9.1,pH 9.5 时不稳定,选择硼砂作电泳缓冲液。

2.1.3 缓冲液的 pH 选择:在 pH8.0~10.5 的范围内,比较了 pH 对分离的影响,pH>9 时,出峰时间延长,两个峰逐渐分开,分离度逐渐改善,但柱效下降(如图 2); pH<9 时,只有一个峰,出峰较早,pH 改变对迁移时间和分离度的影响均不大,图略。可见 pH10.0 硼砂溶液效果较好。

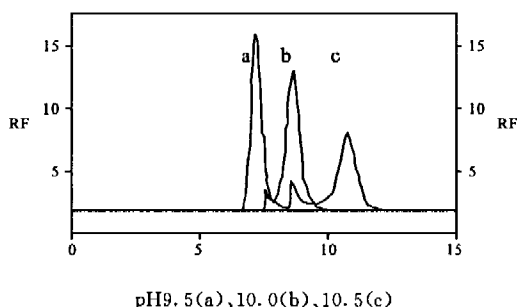


图 2 25 mmol/L 硼砂溶液不同 pH 的电泳图谱

2.1.4 缓冲液浓度:从 10~75 mmol/L 不同浓度的硼砂溶液都能将血清脂蛋白分出两条区带,但随着缓冲液浓度增高,出峰时间延长,区带展宽,峰高下降,检测灵敏度下降(如图 3),故低浓度的溶液效果较好。详细比较了 5~25 mmol/L 的硼砂溶液,如图 4.a 和 4.b,可见 10~20 mmol/L 之间,第

一个峰有分离趋势,而 15 mmol/L 硼砂最佳。

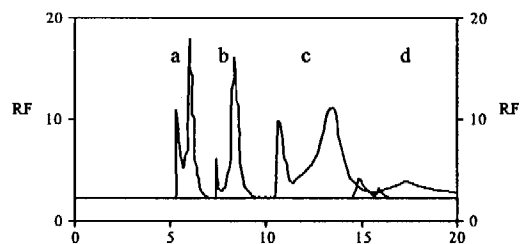


图 3 pH 10.0 不同浓度硼砂溶液电泳图谱

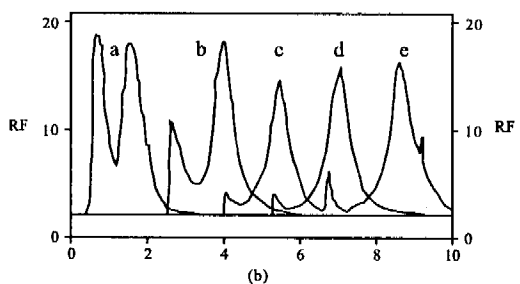
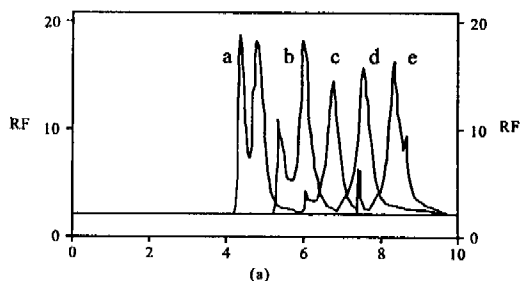


图 4 5(a)、10(b)、15(c)、20(d)、25(e)mmol/L,图 b 为 a 图放大,取图谱 4~9 min

图 4 pH10.0 不同浓度硼砂溶液电泳图谱

2.1.5 添加剂:非离子型表面活性剂有动态涂层的作用,可以减少脂蛋白在毛细管内壁的吸附。本实验中比较了 Triton X-100、NP40、Brij35 和 Tween20 的作用,加入表面活性剂,分离度提高,可分出三个峰;Brij35 的峰形锐利且 0.001% Brij35 分离度最好,浓度过低分离度下降,浓度过高峰重叠(图略),故只能选用 0.001 g/dl Brij35。

2.1.6 综合上述因素,选用含 0.001 g/dl Brij 35, pH 10.0 的 15 mmol/L 硼砂溶液作电泳缓冲液,25 ℃恒温,25 kV 恒压分离,结果如图 4。

2.2 重复性试验

2.2.1 批内重复性:同一份衍生标本连续电泳 8 次,迁移时间 CV0.3%~0.6%,峰面积 CV0.7%~4.8%。

2.2.2 批间重复性:连续 8 d 对同一份标本分析,迁移时间 CV0.8%~3.8%。

2.3 两种方法比较 胆固醇正常的标本 40 例分

别进行毛细管电泳与 Helena 电泳, 图 5 和图 6 为典型的电泳结果。

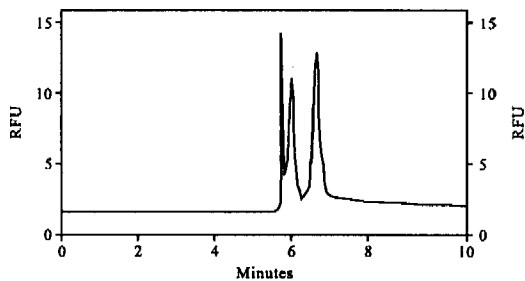


图 5 含 0.001 g/dl Brij35, 15 mmol/L 硼砂溶液 pH10.0, 25kV 恒压毛细管电泳分离图谱

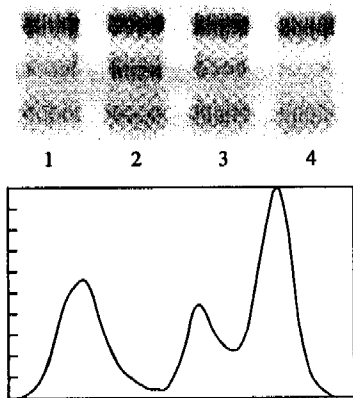


图 6 Helena Rep 电泳结果和扫描图谱(对应于电泳图 3)

5 讨论 毛细管电泳用于脂蛋白分析从 1992 年 Tadey 等开始, 主要侧重于载脂蛋白的分离, 需要先用超速离心分离提纯某种脂蛋白成分, 脱脂处理后进行毛细管电泳, 可对载脂蛋白定量, 结果与免疫学方法相符<sup>[2,3]</sup>。Weiller 等<sup>[4]</sup>比较了色谱、毛细管电泳及微流控芯片三种方法分离脂蛋白的情况, 保留时间分别为 10~30 min, 10~15 min, 20~40 s, 提出这些方法分析临床标本的可行性。微流控技术在极短的时间可得到较好的分离结果, 但由于目前制作工艺的限制, 芯片成本高, 蛋白在管壁吸附的现象更为严重, 所以我们仍然先用毛细管电泳法开展实验。

毛细管电泳分离模式多样, 我们选择最简单、最常用的自由溶液区带电泳。熔融硅毛细管在 pH > 3 时带负电荷, 与缓冲液形成双电层, 在电场力作用下, 边缘带正电的缓冲液向负极迁移形成电渗流(EOF); 而脂蛋白颗粒在碱性条件下带负电荷向正极泳动, 脂蛋白颗粒在 EOF 带动下向负极迁移并根据质荷比不同而分离, 因此, EOF 是影响分离效率和分离选择性的重要因素。EOF 随 pH 升高而增加呈“S”形, 到碱性条件下变化不大, 单纯 pH 增加使 EOF 增加的幅度较小。pH > 9 时用 NaOH 调节, pH 升高的同时离子强度增加, 双电层变薄,

EOF 减小, 迁移时间延长。缓冲液浓度也通过影响双电层厚度使 EOF 减小。表面活性剂的作用是通过改变双电层局部黏度使 EOF 减小。因  $R_s$  与 EOF 呈负相关<sup>[4]</sup>, 适当降低 EOF 改善分离效果, 因此本文选用含 0.001 g/dl Brij35 pH 10.0 的硼砂缓冲液。

蛋白质在毛细管内壁的吸附是影响分离结果的重要因素, 可引起拖尾、变形甚至消失。脂蛋白中蛋白成分的等电点一般小于 6, 在 pH 10.0 的强碱性条件下带负电, 与带负电的硅羟基相互排斥, 在很大程度上减少蛋白质的吸附。非离子表面活性剂 Brij 35 在电泳过程中会在毛细管内壁形成动态的亲水表层, 抑制脂蛋白吸附。

此外, 适当提高场强和分离柱有效长度也可以改善分离度。虽然减少毛细管长度可能会缩短分析时间, 但为了保证分离效果本文未采用。本文所用分离柱有效长度为 50 cm, 毛细管电泳分离场强为 417 V/cm, 琼脂糖凝胶电泳场强为 400 V/cm, 两者比较近似, 但前者 10 min 内即已较好地分离, 速度加快, 主要原因是由强大的 EOF 带动, 柱效提高。但脂蛋白具有多态性, 脂质和蛋白分布不同, 各组分会有一些迁移速度有差异的异构体, 因此实际的柱效只能达到  $10^4 \sim 10^5$  片/m。从峰形和出峰时间来看毛细管电泳还是较全自动凝胶电泳仪优越。Weiller 等用 pH9.0 的 40 mmol/L Tricine-methylglutamine 缓冲液 28 kV 恒压分离 NBD-酰基鞘氨醇预染的脂蛋白在 7.8~8.8 min 间出峰<sup>[4]</sup>, 我们实验在 5~7 min 即出峰且缓冲液易得。

脂蛋白预染方面, 我们先分析了苏丹黑 B 预染血清, DAD 检测。由于进样量极少(nl 级), DAD 检测器的光源氙灯在特征波长 570 nm 处输出小, 检测灵敏度低, 并且, 苏丹黑 B 与脂蛋白的结合量随染料浓度增加而增加, 染料浓度和脂蛋白与染料亲和力和影响脂蛋白定量<sup>[5]</sup>, 因此, 需要考虑其它检测方法。LIF 检测灵敏度高, 较 PDA 高几个数量级, 但需要特殊的荧光染料。NBD C<sub>6</sub>-酰基鞘氨醇是一种荧光标记的磷脂类似物, 可通过疏水作用与脂蛋白表面磷脂/胆固醇膜结合, 对血清脂蛋白的标记具有特异性和饱和性, 可用来定量脂蛋白的各种组分<sup>[5,6]</sup>, 标记血清只需室温孵育 1 min, 处理样品时间短, 总分析时间相应缩短。

从标准品加入实验来看, 毛细管电泳 HDL 只存在于第三个峰, LDL 在前两个峰中都存在, 三个峰不能与琼脂糖凝胶电泳一一对应, 但通过电泳迁移的位置不同研究脂蛋白属性, 毛细管电泳不失为一种新方法。今后, 我们将结合其它分析方法研究这三种成分的属性, 并进一步研究血脂异常的标本

电泳情况,以便将毛细管用于脂蛋白的定量和高脂血症的诊治。

#### 参考文献:

- [1] 周小棉,邹晓,陈顺金. 血清蛋白的毛细管电泳分析[J]. 临床检验杂志, 1998,16(4):203—205.
- [2] Gordon MJ, Lee KJ, Arias AA, et al. Protocol for resolving protein mixtures in capillary zone electrophoresis[J]. *Anal Chem*, 1991,63(1):69—72.
- [3] Tadey T, Purdy WC. Characterization of plasma apolipoproteins by capillary electrophoresis [J]. *J Chromatogr*, 1992,583(1):111—115.
- [4] Cruzado ID, Cockrill SL, McNeal CJ, et al. Characterization and quantitation of apolipoprotein B-100

by capillary electrophoresis[J]. *J Lipid Res*, 1998,39(1):205—217.

- [5] 邓延倬,何金兰. 高效毛细管电泳[M]. 北京:科学出版社,2000:.
- [6] Weiller BH, Ceriotti L, Shibata T, et al. Analysis of lipoproteins by capillary zone electrophoresis in microfluidic devices: assay development and surface roughness measurements [J]. *Anal Chem*, 2002,74(7):1702—1711.
- [7] Schmitz G, Mollers C, Richter V. Analytical capillary isotachopheresis of human serum lipoproteins [J]. *Electrophoresis*, 1997,18(10):1807—1813.

收稿日期:2005-07-18

## 清蛋白试剂对总蛋白测定的交叉污染分析

金 幸,尤 昕,张永芬 (延边大学医学院附属医院检验科,吉林延吉 133000)

**摘要:**目的 探讨7150自动生化分析仪清蛋白试剂对总蛋白测定的影响。方法 观察总蛋白检测时600,660,700 nm三种副波长条件下清蛋白对总蛋白的交叉污染。结果 总蛋白检测副波长设置在600 nm时清蛋白对其交叉污染明显。结论 总蛋白副波长设置不当可能影响其测定结果。

**关键词:**交叉污染;总蛋白;清蛋白

**中图分类号:**R446 **文献标识码:**B **文章编号:**1671-7414(2006)01-018-01

自动生化分析仪测定生化指标具有高效、精确、微量等优点,但部分项目间也存在交叉污染问题<sup>[1,2]</sup>。日立7150自动化分析仪的工作方式是以标本的先后为顺序,即先测试一个标本的所有实验项目,再测试下一个标本。这种方式的问题是,一个项目可能对紧随其后的一个甚至几个项目的测定带来一定程度的试剂污染,并且随着仪器使用时间的累加,试剂交叉污染的程度会有所加剧。我们在使用过程中发现,总蛋白测定结果常常偏低。就此问题我们进行了实验观察,并对如何避免这种现象进行了探讨。

### 1 材料与方法

1.1 材料 ①仪器:日立7150自动生化分析仪。②试剂:总蛋白(TP)双缩脲法试剂盒、清蛋白(ALB)溴甲酚绿(BCG)法试剂盒,由长征公司提供。③总蛋白测定参数:一点终点法,监测点:50,血清量5 μl,试剂量250 μl(单一试剂),主波长546 nm,分别采用600,660,700 nm三种副波长进行测定。

1.2 方法 取一无溶血、无乳糜的混合血清,先检测一次总蛋白,再测一次清蛋白,然后连续测定五次总蛋白,观察总蛋白分别采用600,660,700 nm副波长时的吸光度值和测定结果。

2 结果 总蛋白的副波长分别设置在600,660,700 nm条件下清蛋白对总蛋白的交叉污染实验数据见表1。数据显示总蛋白检测副波长设置在600 nm时,清蛋白对其交叉污染明显,而副波长设置在660 nm和700 nm时清蛋白对其测定结果无影响。

3 讨论 自动生化分析仪的试剂针要接触各种试剂,仅使用水清洗一遍,一般难于清洗干净,有一定残留,容易造成

分析项目间的交叉污染。我们发现总蛋白测定结果偏低时,首先考虑到交叉污染问题。因此,将自动分析仪设置的所有项目进行了对总蛋白交叉污染实验观察,确定清蛋白试剂对其有干扰。经过对白蛋白和总蛋白试验参数分析后,发现清蛋白检测采用600 nm作为主波长,总蛋白采用600 nm作为副波长,当吸取清蛋白试剂后再吸取总蛋白试剂,如果后者受到前者的污染,其在副波长下测得的吸光度值很可能要偏高,因此认为总蛋白结果偏低的原因可能是其副波长设置不当。将总蛋白检测的副波长改为660 nm或700 nm后,得到了满意的总蛋白检测结果。目前大多数自动生化分析仪采用双波长检测,因此,副波长的最佳选择是一个值得注意的问题。

表1 TP在三种副波长条件下ALB对其检测结果的影响(g/L)

副波长	先测的TP结果	TP结果(先测ALB再测TP)				
		第1次	第2次	第3次	第4次	第5次
600 nm	72.0	50.0	68.2	70.1	72.1	71.9
660 nm	72.0	72.1	72.1	72.0	72.3	72.1
700 nm	72.1	72.2	72.1	72.0	72.3	72.2

### 参考文献:

- [1] 尤 昕,任淑子,李玉花,等. 交叉污染对血清无机磷自动分析的影响[J]. 延边大学医学院学报,2004,27(2):113.
- [2] 尤 昕,任淑子,魏学峰,等. 交叉污染对血清甘油三酯自动分析的影响[J]. 吉林医学,2004,21(10):168.

收稿日期:2005-08-18