



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101718746 A

(43) 申请公布日 2010. 06. 02

(21) 申请号 200910265395. 7

(22) 申请日 2009. 12. 30

(71) 申请人 中国科学院长春应用化学研究所
地址 130000 吉林省长春市人民大街 5625 号

(72) 发明人 徐国宝 李海娟

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227
代理人 魏晓波 逯长明

(51) Int. Cl.
G01N 27/447(2006. 01)

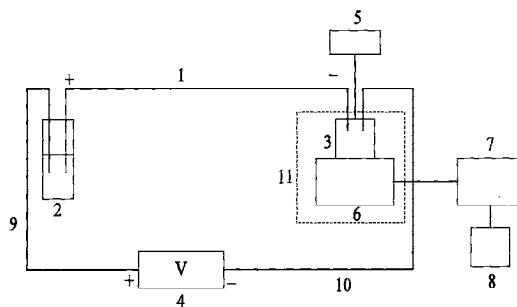
权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种肌氨酸的检测方法

(57) 摘要

本发明实施例公开了一种肌氨酸的检测方法,该方法包括:提供毛细管电泳电化学发光检测用毛细管;向所述毛细管电泳电化学发光检测装置中添加背景缓冲液及吡啶钌系衍生物;向所述毛细管中注入运行缓冲液,并在所述毛细管内填充有运行缓冲液的状态下,向所述毛细管内注入样品溶液;在所述毛细管两端施加电压,进行毛细管电泳电化学发光检测。本发明中,我们选择吡啶钌系衍生物作为发光试剂,并优选使用具有高灵敏度和高稳定性的联吡啶钌,通过简单的仪器,实现了对肌氨酸高效、快速地检测,并且此种方法较色谱-质谱联法相对便宜。



1. 一种肌氨酸的检测方法,其特征在于,包括:
提供毛细管电泳电化学发光检测用毛细管;
向所述毛细管电泳电化学发光检测装置中添加背景缓冲液及吡啶钌系衍生物;
向所述毛细管中注入运行缓冲液,并在所述毛细管内填充有运行缓冲液的状态下,向所述毛细管内注入样品溶液;
在所述毛细管两端施加电压,进行毛细管电泳电化学发光检测。
2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述吡啶钌系衍生物为联吡啶钌。
3. 根据权利要求1所述的检测方法,其特征在于,所述提供毛细管电泳电化学发光检测用毛细管的步骤包括:使用具有阴极性基团的化合物在所述毛细管的内壁上形成阴极性层。
4. 根据权利要求3所述的检测方法,其特征在于,所述具有阴极性基团的化合物为甲硅烷基化剂。
5. 根据权利要求4所述的检测方法,其特征在于,所述阴极性层通过共价键键合到所述毛细管的内壁。
6. 根据权利要求1所述的检测方法,其特征在于,所述毛细管为二氧化硅材质。
7. 根据权利要求1所述的检测方法,其特征在于,所述背景缓冲液包括 pH 值为 7-9 的盐溶液。
8. 根据权利要求7所述的检测方法,其特征在于,所述盐溶液为磷酸盐溶液。
9. 根据权利要求1所述的检测方法,其特征在于,所述运行缓冲液包括 pH 值为 7-9 的盐溶液。
10. 根据权利要求9所述的检测方法,其特征在于,所述盐溶液为磷酸盐溶液。

一种肌氨酸的检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种化学物质的检测方法,尤其涉及一种肌氨酸的检测方法。

背景技术

[0002] 肌氨酸 (Sarcosine),亦名 N-甲基甘氨酸或 2-甲氨基乙酸,可以由氯乙酸与甲胺反应制得。肌氨酸通常以磷酸肌酸的形式存在于人体或动物的肌肉中,可以提高人体的智力,增长肌肉的无氧力和爆发力。

[0003] 发表在 2009 年 2 月 12 日《自然》杂志 (Nature 2009, 457 :910) 上的文章指出,肌氨酸可以有效反映癌细胞的侵袭性,可辨别癌细胞的生长行为,当研究者将肌氨酸加入良性前列腺细胞的培养基后,良性前列腺细胞便具备了侵袭性,呈现出了癌细胞的生物学特性,由此可表明肌氨酸有可能参与了癌变过程。因此,对肌氨酸进行快速、灵敏地检测便具有了重要的意义。

[0004] 当前所使用的检测技术包括色谱-质谱联用法及毛细管电泳法等。现有技术中,对肌氨酸的检测主要通过色谱-质谱联法实现,色谱-质谱联用法是将色谱的分离能力与质谱的定性功能结合起来,以实现混合物的定性分析,其中,色谱包括液相色谱和气相色谱,但是,液相色谱和气相色谱的分离效率较低,而与它们联合使用的质谱检测器却又价格昂贵,这样就限制了色谱-质谱联用法的使用。

[0005] 毛细管电泳 (CE) 法具有简单、高效、快速且样品用量少等优点,将电化学发光应用于毛细管电泳 (CE) 而形成的毛细管电泳电化学检测技术已成为一种理想的检测技术,应用此技术已成功地实现了对蛋白质、氨基酸、多肽等物质的分析,但是现有技术中还没有应用此方法实现对肌氨酸的检测,因此,要提供一种毛细管电泳电化学的方法以实现肌氨酸进行高效、快速且较为便宜的检测。

发明内容

[0006] 有鉴于此,本发明提供一种肌氨酸的检测方法,以实现肌氨酸进行高效、快速且较为便宜的检测。

[0007] 为实现上述技术问题,本发明提供如下技术方案:

[0008] 一种肌氨酸的检测方法,包括:

[0009] 提供毛细管电泳电化学发光检测用毛细管;

[0010] 向所述毛细管电泳电化学发光检测装置中添加背景缓冲液及吡啶钌系衍生物;

[0011] 向所述毛细管中注入运行缓冲液,并在所述毛细管内填充有运行缓冲液的状态下,向所述毛细管内注入样品溶液;

[0012] 在所述毛细管两端施加电压,进行毛细管电泳电化学发光检测。

[0013] 优选的,所述吡啶钌系衍生物具体为联吡啶钌。

[0014] 优选的,所述提供毛细管电泳电化学发光检测用毛细管的步骤包括:使用具有阴离子基团的化合物在所述毛细管的内壁上形成阴离子层。

- [0015] 优选的,所述具有阴极性基团的化合物为甲硅烷基化剂。
- [0016] 优选的,所述阴极性层通过共价键键合在所述毛细管的内壁。
- [0017] 优选的,所述毛细管为二氧化硅材质。
- [0018] 优选的,所述背景缓冲液为 pH 值为 7-9 的盐溶液。
- [0019] 优选的,所述背景缓冲液为磷酸盐溶液。
- [0020] 优选的,所述运行缓冲液为 pH 值为 7-9 的盐溶液。
- [0021] 优选的,所述运行缓冲液为磷酸盐溶液。
- [0022] 本发明公开了一种使用毛细管电泳电化学发光对肌氨酸进行检测的方法,在本发明中,我们选择吡啶钉系衍生物作为发光试剂,并优选使用具有高灵敏度和高稳定性的联吡啶钉,通过简单的仪器,实现了对肌氨酸高效、快速地检测,并且此种方法较色谱-质谱联法相对便宜。

附图说明

- [0023] 图 1 为本发明实施例公开的一种肌氨酸的检测方法所用的装置示意图;
- [0024] 图 2 为本发明实施例公开的肌氨酸的电泳检测图。

具体实施方式

[0025] 在本发明中,所述的电泳缓冲液可以是适用于所需分离的任何已知缓冲溶液,用于一般电泳,或者具体地说是毛细管电泳。所述缓冲溶液可以是水相缓冲溶液,也可以是非水相缓冲溶液。水相缓冲溶液的具体例子可以为硼酸盐缓冲液、磷酸盐缓冲液和碳酸盐缓冲液等,也可以是以肌氨酸为基础的缓冲液和已知为生物液体的缓冲液。按照本发明,还可以在所述电泳缓冲液中添加有机溶剂、表面活性剂、离子液体、纳米粒子中的一种或多种,用于改善分离检测效果,对此本发明并无特别限制。

[0026] 可以引用的生物缓冲液的实例可包括:双-TRIS(2-二[2-羟基乙基]氨基-2-羟基甲基-1,3-丙二醇)、ADA(N-[2-乙酰氨基]-2-亚氨基乙酸)、ACES(2-[2-乙酰胺基]-2-氨基乙磺酸)、PIPES(1,4-哌嗪二乙磺酸)、MOPSO(3-[N-吗啉基]-2-羟基丙磺酸)、双-TRIS PROPANE(1,3-二[三(羟基甲基)甲基氨基甲烷])、BES(N,N-二[2-羟基乙基]-2-氨基乙磺酸)、MOPS(3-[N-吗啉基]丙磺酸)、TES(2-[2-羟基-1,1-二(羟基甲基)乙基氨基]乙磺酸)、HEPES(N-[2-羟基乙基]哌嗪-N'-(2-乙磺)酸)、DIPSO(3-N,N-二[2-羟基乙基]氨基-2-羟基丙磺酸)、MOBS(4-N-吗啉基丁磺酸)、TAPSO(3[N-三-羟基甲基-甲基氨基]-2-羟基丙磺酸)、TRIS(2-氨基-2-[羟基甲基]-1,3-丙醇)、HEPPSO(N-[2-羟基乙基]哌嗪-N'-[2-羟基丙磺]酸)、POPSO(哌嗪-N,N'-二[2-羟基丙磺]酸)、TEA(三乙胺)、EPPS(N-[2-羟基乙基]-哌嗪-N'-[3-丙磺]酸)、TRICINE(N-三[羟基甲基]甲基甘氨酸)、GLY-GLY(二甘氨酸)、BICINE(N,N-二[2-羟基乙基]甘氨酸)、HEPBS(N-[2-羟基乙基]哌嗪-N'-[4-丁磺]酸)、TAPS(N-三[羟基甲基]甲基-3-氨基丙磺酸)、AMPO(2-氨基-2-甲基-1,3-丙二醇)、TABS(N-三[羟基甲基]甲基-4-氨基丁磺酸)、AMPSO(3-[1,1-二甲基-2-羟基乙基]氨基]-2-羟基丙磺酸)、CHES(2-(N-环己基氨酸)乙磺酸)、CAPSO(3-[环乙基氨基]-2-羟基-1-丙磺酸)、AMP(2-氨基-2-甲基-1-丙醇)、CAPS(3-环乙基氨基-1-丙磺酸)和 CABS(4-[环乙基氨

基]-1-丁磺酸), 优选 AMPD、TABS、AMPSO、CHES、CAPSO、AMP、CAPS 或 CABS。

[0027] 所述生物液体的缓冲液中的 pH 值可以是 2-12。然而, 就碱性 pH 毛细管电泳而言, 其 pH 值是 8-12, 优选为 9。

[0028] 本发明所使用的缓冲液优选使用 pH 值为 7-9 的磷酸盐溶液, 优选使用 pH 值为 8.5 的磷酸盐溶液作为背景缓冲液, 使用 pH 值为 9 的磷酸盐溶液作为运行缓冲液。

[0029] 在本发明中, 所述的电泳毛细管的材料可以是玻璃、熔融二氧化硅、塑料等, 对此, 本发明不作特别地限定。玻璃制或熔融二氧化硅制的毛细管的内壁通常为具有阴性电荷的状态。塑料制的毛细管内壁根据塑料中的有无极性基团或极性基团的种类而成为具有阳性或阴性电荷的状态或为无电荷(无极性)的状态。此外, 即使是不具有极性基团的塑料, 也可能通过导入极性基团, 从而成为具有电荷的状态。作为上述塑料制的毛细管, 可以使用市售品, 可以是如聚甲基丙烯酸甲酯、聚碳酸酯、聚苯乙烯、聚乙烯、聚四氟乙烯、聚醚醚酮等形成的毛细管。

[0030] 上述毛细管的内径可在 10-2000 μm 的范围内, 优选为 15-200 μm , 更优选为 25-100 μm , 外径可在 300-2500 μm 的范围内, 优选为 350-400 μm , 上述毛细管的长度可在 20-1000mm 的范围内, 优选为 60-1000mm。

[0031] 所述市售毛细管会有根据分析需要将内壁进行处理的毛细管, 对于使用熟练的人员可以根据需要选择相适应的毛细管的性能, 对于非熟练人员优选使用内表面未经处理的毛细管。

[0032] 本发明所准备的毛细管可以为通过具有阴极性基团的化合物在其内壁上形成阴极性层的毛细管。在上述毛细管为熔融二氧化硅制的情况下, 可以使用具有阴极性基团和硅的化合物, 优选为甲硅烷基化剂。甲硅烷基化剂例如是 2-(4-氯代磺酰基苯基)乙基三甲氧基硅烷、2-(4-氯代磺酰基苯基)乙基三氯硅烷, 在所述甲硅烷基化剂中还可以使用硅原子被钛或锆取代的物质。所述甲硅烷基化剂可以单独使用一种, 也可以将两种以上并用。

[0033] 使用上述甲硅烷基化剂形成阴极性层时, 可以通过下述方式进行。

[0034] 首先, 制备在有机溶剂中溶解或分散甲硅烷基化剂的处理液。作为在上述处理液的制备中使用的上述有机溶剂, 可以使用例如二氯甲烷、甲苯等。对上述处理液中的甲硅烷基化剂的浓度没有特别的限定。将该处理液通入到熔融二氧化硅制的毛细管内, 加热。通过该加热, 上述甲硅烷基化剂通过共价键键合到上述毛细管内壁, 其结果, 阴极性基团被配置在上述毛细管内壁。然后, 进行后处理过程, 即, 对上述内壁具有阴极性层的毛细管进行洗涤, 可使用有机溶剂(二氯甲烷、甲醇、丙酮等)、酸性溶液(磷酸等)、碱性溶液和表面活性剂溶液的至少一种进行洗涤, 该洗涤是任意进行的, 优选为进行洗涤。通过上述甲硅烷基化剂形成有阴极性层的毛细管可以使用市售品。

[0035] 所述样品溶液为待分析的样品溶液, 可以是使用适宜的稀释溶液稀释过的样品溶液, 也可以选择使用电泳缓冲溶液稀释过的样品溶液, 当然也可以是纯的样品。

[0036] 本发明所使用的样品溶液为被稀释的肌氨酸溶液, 所述肌氨酸可以是来自健康人体或患者的任何肌肉组织或体液(如血液、尿液、唾液等)中的肌氨酸, 也可以是从除人体外的动物源中所提取的肌氨酸, 还可以是化学合成的肌氨酸。

[0037] 对肌氨酸的稀释溶剂可以选择酸类或醇类有机溶剂, 如甲酸(HCOOH)、乙酸

(CH₃COOH)、丙酸 (C₂H₅COOH)、乙二酸 (C₂H₂O₄)、磺酸 (-SO₃H)、亚磺酸 (RSO₃H)、硫酸 (RCOSH)、苯甲酸 (C₆H₅-COOCH₃)、水杨酸 (C₆H₄(OH)(COOH))、甲醇 (CH₃OH)、乙醇 (C₂H₅OH)、丙醇 (C₃H₇OH)、乙二醇 (CH₂(OH)CH₂(OH)) 等。

[0038] 本发明所使用的化学发光试剂可以为吡啶钌系的各种衍生物,如联吡啶钌 (Ru(bpy)₃²⁺)、邻菲罗啉钌等。本发明优选使用电化学发光具有高灵敏度和高稳定性的联吡啶钌 (Ru(bpy)₃²⁺)。

[0039] 本发明中所使用的实现肌氨酸检测方法的毛细管电泳电化学装置可以为如图 1 所示的装置,而限于下述装置,如图 1 所示,该装置包括:电泳毛细管 1、检测池 3、高压电源 4、恒电位仪 5、光电倍增管 6、光测定仪 7 和数据记录仪 8,其中,电泳毛细管 1 的一端插入电泳池 2 中的运行缓冲液中,另一端插入检测池 3,高压电源 4 的正极通过铂丝 9 相连,铂丝 9 的另一端插入电泳池 2,铂丝 10 的一端与电源 4 的负极相连,另一端插入检测池 3 中,恒电位仪 5 与检测池 3 相连,光电倍增管 6 位于检测池 3 的正下方,光电倍增管 6 接收检测池 4 内的化学发光信号并将信号输入到光测定仪 7,由数据记录仪 8 记录检测结果。光电倍增管 6 和检测池 4 被置于密闭室 11 中工作,以减少环境噪音对结果的影响。

[0040] 本发明检测肌氨酸的方法可以通过如下方式实施。

[0041] 首先,制备熔融二氧化硅制的毛细管,该制备过程如上述所述的制备过程。在进行检测前,先将该毛细管进行清洗,清洗过程可以是,经 1mol/L 的 NaOH 溶液、1mol/L 的 HCl 溶液进行清洗后,再经去离子水清洗,最后使用电泳缓冲液进行清洗,以确保电泳毛细管内壁不残留其它影响检测工作的杂质,所述每次清洗时间可选为 15-30 分钟,优选为 25 分钟,上述清洗的溶液可以通过泵施加压力注入所述毛细管内,所施加的通液压力可以是 0.05-0.1MPa。向检测池中加入发光试剂吡啶钌系衍生物及背景缓冲液,向电泳池中加入运行缓冲液。接着,在上述毛细管内,再通过泵施加 0.05-0.1MPa 的压力,向其通入运行缓冲液,在上述毛细管内填充有上述运行缓冲液的状态下,向上述毛细管内导入样品溶液,所述样品溶液可以是使用适宜的稀释溶剂稀释过的样品溶液,也可以选择使用电泳缓冲液稀释过的样品溶液,也可以是纯的样品,上述样品溶液的导入从所述毛细管的阳极侧进行。通过施加电压,在上述毛细管中的运行缓冲液中产生电渗流,流向毛细管阴极侧的物质在检测池内发光试剂吡啶钌系衍生物的作用下产生电化学发光信号,由光电倍增管接收检测池内的化学发光信号并将信号输入到光测定仪,由数据记录仪记录检测结果。上述电压的施加程度可以为 10KV-30KV,优选为 20KV(千伏的单位是 KV)。在上述检测过程中,光电倍增管和检测池被置于密闭室中工作,以减少环境噪音对结果的影响。

[0042] 以下,对本发明的实施例进行说明。

[0043] 实施例 1:

[0044] 本实施例中选用 10 μm 肌氨酸溶于 1mM 乙酸溶剂的肌氨酸溶液作为待测样品溶液;

[0045] 本实施例所使用的电泳缓冲液包括 pH 值为 7-9 的磷酸盐溶液,优选使用 pH 值为 8.5 的磷酸盐溶液作为背景缓冲液,使用 pH 值为 9 的磷酸盐溶液作为运行缓冲液。

[0046] 本实施例所使用的化学发光试剂为 5mM 联吡啶钌 (Ru(bpy)₃²⁺)。

[0047] 所有溶液在使用前均经 0.22 μm 聚四氟乙烯微孔滤膜过滤。

[0048] 本实施例的具体步骤如下:

[0049] 1、将电泳毛细管进行清洗,清洗过程可以是经 1mol/L 的 NaOH 溶液、1mol/L 的 HCl 溶液进行清洗后,再经去离子水清洗,最后使用电泳缓冲液进行清洗,以确保电泳毛细管内壁不残留其它影响检测工作的杂质,所述每次清洗时间可选为 15-30 分钟,优选为 25 分钟,所述清洗溶液可以通过泵施加压力注入所述毛细管内,通液的压力可以是 0.05-0.1MPa;

[0050] 2、向检测池内注入 5mol/L 的化学发光试剂联吡啶钌 ($\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$) 和 pH 值为 8.5 的背景缓冲液,向电泳池内注入运行缓冲液;

[0051] 3、通过泵施加压力(可以是 0.05-0.1MPa),将电泳毛细管内充满运行缓冲液。其插入电泳池的一端为电泳毛细管的正极端,插入检测池的一端为电泳毛细管的负极端;

[0052] 4、在所述毛细管内填充有上述运行缓冲液的状态下,通过 18KV 进样电压的作用,从上述毛细管的正极端处导入待测样品溶液,进样时间为 30s;

[0053] 5、对电泳毛细管两端施加 20KV 电压进行电泳,在上述毛细管中的运行缓冲液中产生电渗流,流向毛细管阴极侧的物质在检测池内的发光试剂联吡啶钌 ($\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$) 的作用下产生化学发光信号,由光电倍增管接收检测池内的电化学发光信号并将信号输入到光测定仪,由数据记录仪记录检测结果,完成毛细管电泳电化学发光检测,其中,光电倍增管施加 600V 的偏置电压,恒电位仪提供 1.15V 的恒电位。

[0054] 在上述检测过程中,光电倍增管和检测池被置于密闭室中工作,以减少环境噪音对结果的影响。

[0055] 检测结果,参见图 2,图中横坐标是检测时间,单位为 s;纵坐标是肌氨酸的电化学发光强度,从图 2 中可以看出,通过使用毛细管电泳电化学方法,可以在 10 分钟内完成肌氨酸的高效检测,并得到发光信息的平均强度为 80.9。

[0056] 本发明公开了一种使用毛细管电泳电化学发光对肌氨酸进行检测的方法,在本发明中,我们选择具有高灵敏度和高稳定性的联吡啶钌 ($\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$) 作为发光试剂,通过简单的仪器,实现了对肌氨酸高效、快速的检测,并且此种方法较色谱-质谱联法相对便宜。

[0057] 以上为对本发明所公开的一种使用毛细管电泳电化学发光检测肌氨酸方法的说明。对所公开的实施例的上述说明,使本领域专业技术人员能够实现或使用本发明。对这些实施例的多种修改对本领域的专业技术人员来说将是显而易见的,本文中所定义的一般原理可以在不脱离本发明的精神或范围的情况下,在其它实施例中实现。因此,本发明将不会被限制于本文所示的这些实施例,而是要符合与本文所公开的原理和新颖特点相一致的最宽的范围。

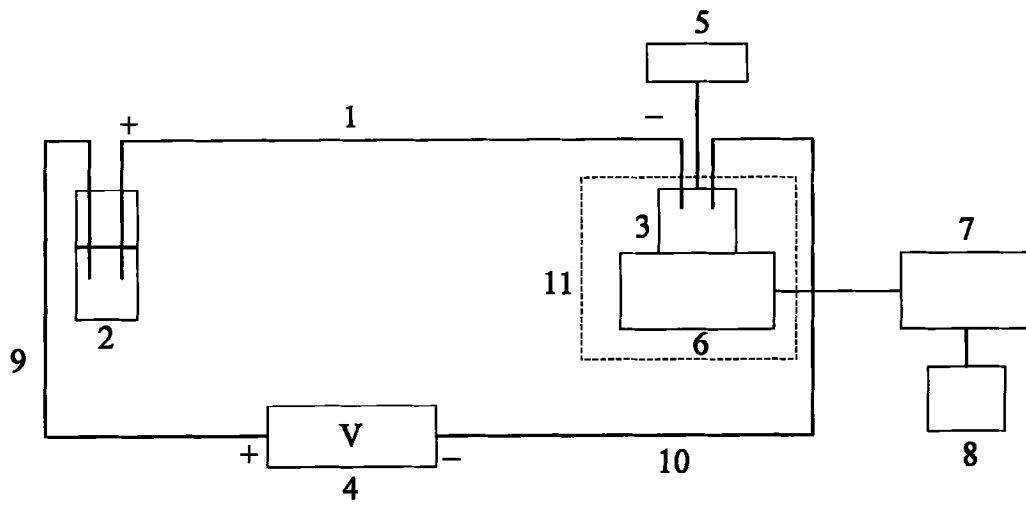


图 1

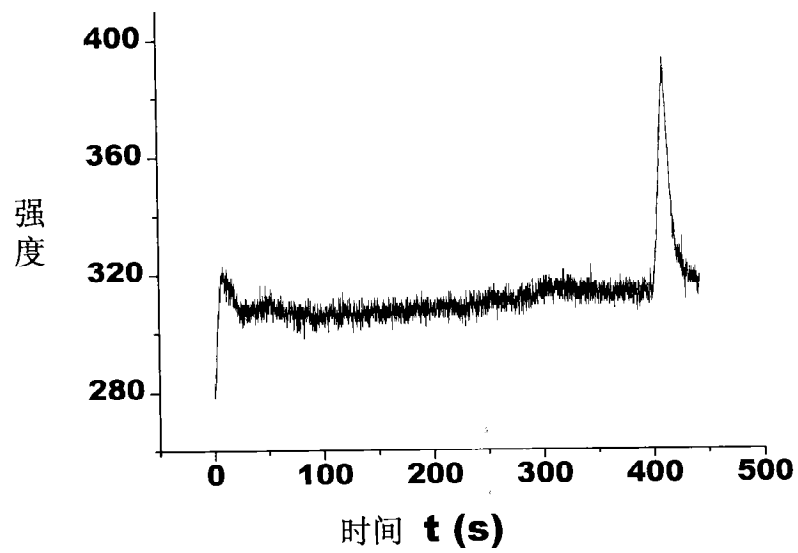


图 2