

肿瘤标记物 1-甲基鸟苷的微分脉冲伏安法的研究

张 兰, 杨 娟, 陈 江, 陈国南

(福州大学化学化工学院, 广东 福州 350002)

摘 要: 建立一种灵敏的测定修饰核苷 1-甲基鸟苷(1-MG)的电化学分析方法. 在 pH 为 2.00 的 BR 缓冲液中, 用循环伏安法(CV), 线性扫描伏安法(LSV), 方波伏安法(SWV), 微分脉冲伏安法(DPV)等现代电化学技术研究了肿瘤标记物 1-甲基鸟苷在玻碳电极(GCE)上的伏安行为. 实验结果表明, pH 为 2.00 的 BR 缓冲液中, 1-甲基鸟苷在 +1.16 V(vs. 甘汞)电位处产生一个灵敏的微分脉冲阳极氧化峰, 该氧化峰的峰电流值与 1-甲基鸟苷的浓度在 $4.0 \times 10^{-7} \sim 1.0 \times 10^{-5}$ mol/L 范围内呈良好的线性关系, 最低检测限达(定义为 $D = 2\sigma/K$) 6.6×10^{-8} mol/L. 将该法应用于兔血清及尿样中 1-甲基鸟苷的测定, 回收率在 96.0% ~ 102.0% 之间, 5 次测定的相对标准偏差(RSD)均小于 3.5%. 并初步研究了 1-甲基鸟苷的电化学机理.

关键词: 1-甲基鸟苷; 修饰核苷; 微分脉冲伏安法(DPV)

中图分类号: O657.72

文献标识码: B

文章编号: 1006-3757(2004)02-0121-05

1-甲基鸟苷(1-Methylguanosine, 简称 1-MG), 其结构简式见图 1. 主要来自于 tRNA 的降解, 是尿液中含量较高的修饰核苷之一, 许多研究已证实癌症患者尿液和血清中修饰核苷的含量高于正常人, 可以作为肿瘤诊断的有用的标记物之一, 因此尿液中 1-甲基鸟苷的测定对恶性肿瘤的早期诊断、预防及治疗都有极大的临床价值^[1, 2]. 已报道的核苷检测方法主要有: 免疫分析法、气相色谱法、高效液相色谱法和毛细管电泳^[3~6]. 虽然免疫分析法灵敏度高, 但特异性差, 并且要接触同位素, 有一定的危险性; 气相色谱法需要衍生, 操作繁琐; 高效液相色谱法和毛细管电泳一般采用紫外检测器, 成本高, 灵敏度低, 而且 HPLC 法柱平衡、分析时间长, 一个尿样需 2 h 左右. 而本文采用简便灵敏的微分脉冲伏安法实现了模拟尿样和模拟血样中修饰核苷 1-甲基鸟苷的快速测定, 结果良好. 同时还对其电化学氧化机制进行了初步探讨.

1 实验部分

1.1 仪 器

CHIA660 电化学工作站(上海辰华仪器公司);

采用三电极系统: 工作电极为玻碳电极(GCE, $S = 0.0707 \text{ cm}^2$), 甘汞电极为参比电极, 铂丝为辅助电极; PHS-2C 型精密酸度计(上海雷磁仪器厂).

1.2 试 剂

1-甲基鸟苷购自 Sigma 公司, 置于冰箱中保存. 其余常用试剂均为分析纯或光谱纯试剂, 实验用水为 Milli-Q 超纯水.

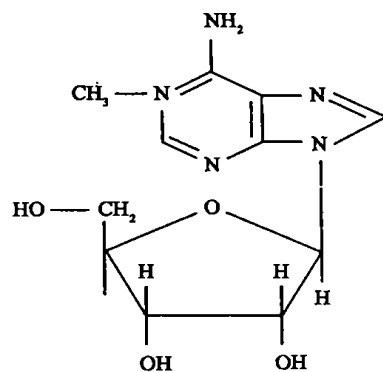


图 1 1-甲基鸟苷结构式

Fig. 1 The structure of 1-Methylguanosine

BR (Britton-Robinson) 缓冲液: 准确称取硼酸 4.9464 g 于烧杯中, 加入冰醋酸 4.6 mL, 磷酸 5.33

收稿日期: 2003-10-27; 修订日期: 2004-02-24.

基金项目: 中国博士后科学基金; 福建省自然科学基金(批准号: F0210004); 福建省教育厅科技发展基金(批准号: JA02143); 福州大学博士后科学发展基金(批准号: XJBH-6102).

作者简介: 张兰(1963-), 女, 博士, 主要从事毛细管电泳和生物分析的研究.

mL, 用超纯水稀释并定容至 1 000 mL, 即配成浓度为 0.04 mol/L 的三酸混合液. 另称取 8 g 氢氧化钠, 也用超纯水溶解并稀释至 1 000 mL, 浓度为 0.2 mol/L. 将这 2 种溶液按不同比例混合即可得所需酸度的 BR 缓冲液.

模拟血清样的制备: 取空白血清 0.5 mL, 于 10 mL 具塞离心管中. 加入无水乙醇至 2.0 mL, 摇匀, 振荡 2 min, 离心 10 min (4 000 r/min), 精密吸取清液 1.0 mL, 加入缓冲液至 5.0 mL, 待用. 空白兔血清由福建医科大学动物中心提供.

模拟尿样的制备: 将尿样 5.0 mL (分别取自 3 名健康人尿液) 摇匀, 振荡 2 min, 离心 10 min (4 000

r/min), 精密吸取清液 0.5 mL, 加入缓冲液至 10.0 mL, 待用.

1.3 实验方法

取含有一定量 1-甲基鸟苷的 BR 缓冲液 (pH 2.00) 5 mL 于电解池内, 采用三电极系统, 选定适当的仪器参数, 在 0.9~1.4 V 电位范围内进行微分脉冲伏安阳极扫描实验. 相对于 BR 缓冲空白而言, 1-甲基鸟苷在 +1.16 V 处左右出现了明显的氧化峰 (见图 2).

玻碳工作电极在测定前用 Al_2O_3 (0.3 μm , Buehler, Lake Bluff, IL) 悬浊液在抛光绒布 (Microcloth, Buehler) 上抛光至镜面, 用石英水冲洗干净

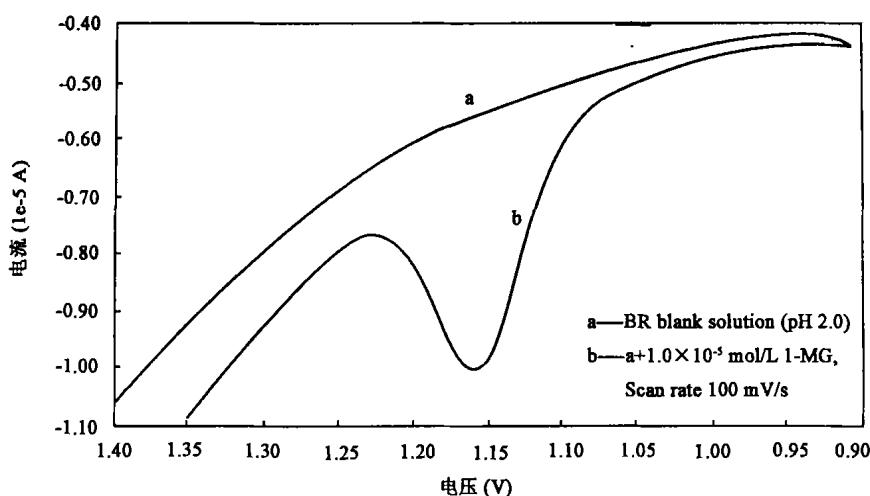


图 2 1-甲基鸟苷的微分脉冲伏安图

Fig. 2 DPV voltammogram of 1-MG

后, 用滤纸吸去水分, 然后置于待测溶液中进行电化学测量. 所有测试均在 25 $^{\circ}\text{C}$ 下进行.

2 结果讨论

2.1 实验条件的选择

本实验在用循环伏安法 (CV)、线性扫描伏安法 (LSV)、方波伏安法 (SWV) 和微分脉冲伏安法 (DPV) 等方法进行比较后, 发现采用 DPV 法测定 1-甲基鸟苷的灵敏度高, 且峰形佳, 因此选择 DPV 对 1-甲基鸟苷进行系统的研究.

2.2 pH 值的选择

在不同酸度的 BR 缓冲液的底液中, 于相同的实验条件下, 测定 (1.0×10^{-5} mol/L) 在不同 pH 时的氧化峰电流 I_p (见图 3). 实验表明, 1-甲基鸟苷的峰电流随着 pH 增大呈下降趋势. 当 pH 在 2.00 时,

标样的峰电流达到最大且相对较稳定, 若偏离此范围, 则峰电流逐渐递减. 所以实验最佳选择为 pH = 2.00.

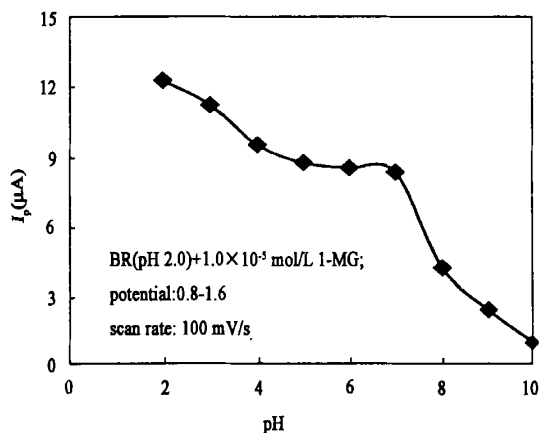


图 3 pH 值和峰电流的关系

Fig. 3 The effect of pH on peak current of 1-MG

此外, 实验中发现 1-甲基鸟苷的峰电位随 pH 的增加而负移, 二者呈良好的线性关系, 表明电极反应过程有质子参与^[7]. 峰电位 pH 的线性方程为:

$$E_p(\text{V}) = -0.0305\text{pH} + 1.1998 \quad (1)$$

$(R^2 = 0.9975)$

2.3 支持电解质的选择

在相同的实验条件下, 分别研究了 1-甲基鸟苷标准溶液($1.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$) 在 6 种酸性支持电解质中(BR 缓冲体系、磷酸缓冲体系、柠檬酸缓冲体系、柠檬酸钠缓冲体系、草酸钠缓冲体系) 的 DPV 氧化行为, 结果表明, 在以上各类缓冲体系中均可产生一个不可逆氧化峰(pH 2.00 时峰电位+ 1.16 V), 但 1-甲基鸟苷在 BR 缓冲液中峰电流较大且峰形理想, 所以选用 BR 缓冲液作为测定介质.

2.4 体系稳定性

在最佳试验条件下, 每隔 15 min 对同一份 1-甲基鸟苷溶液进行 DPV 法测定, 结果表明 1-甲基鸟苷体系在室温下至少可以稳定 4.5 h, 5 h 以后峰电流开始慢慢减小. 因此在 4.5 h 内为最佳测定时间.

2.5 干扰测定

对尿样中可能与 1-甲基鸟苷共存的生物物质和离子进行干扰试验, 结果表明 100 倍的葡萄糖、尿酸、丙氨酸对测定没有干扰; 1 000 倍 Zn^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Na^{+} 、 K^{+} 和 Cl^{-} 对测量基本无影响, 因此该体系完全适用于尿样测定.

2.6 线性范围和检测限

在上述选定的最佳试验条件下, 1-甲基鸟苷的氧化峰电流与浓度在 $4.0 \times 10^{-7} \sim 1.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 范围内呈现良好的线性关系, 浓度与峰电流的线性关系如下:

$$I_p(\mu\text{A}) = 1.0256 C (\mu\text{mol/L}) + 0.0422 \quad (2)$$

$(R^2 = 0.9984)$

检测限为: $6.6 \times 10^{-8} \text{ mol/L}$ (定义为 $D = 2\sigma/K$), 五次平行测定的相对标准偏差 (RSD) 为 2.3%.

2.7 样品测定

对 3 份按 1.2 实验方法处理过的尿样及 1 份兔血清进行定量分析和回收率测定实验, 结果见表 1.

表 1 模拟样品测定
Table1 Analysis of 1-MG in urine samples and serum samples

样品	1-MG 含量 ($\mu\text{mol/L}$)	RSD(%)	加入量 ($\mu\text{mol/L}$)	测出量 ($\mu\text{mol/L}$)	回收率 (%)
尿样 1	1.4	1.9	5.0	6.2	96.0
尿样 2	1.3	3.5	5.0	6.4	102.0
尿样 3	1.4	2.6	5.0	6.3	98.0
血清样	1.6	3.4	5.0	6.5	98.0

BR(pH = 2.00); potential: 0.8~ 1.6 scanrate: 100 mV/s

用本法测定的模拟尿样和兔血清样的 RSD 均小于 3.5% ($n = 5$), 回收率在 96.0% ~ 102.0%, 说明本法准确度和精确度良好, 可望用于实际尿样或血清样的检测.

3 电化学过程研究

3.1 线性扫描伏安法

在 pH 等于 2.00 BR 缓冲液介质中, 采用线性扫描伏安法对浓度为 $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 的 1-甲基鸟苷进行测定, 在 0.8~ 1.6 V 的电位范围内, 以不同的扫描速度观察 1-甲基鸟苷氧化峰电流和峰电位的变化. 实验结果表明, 峰电流和扫描速度(V) 不成线性关系(见图 4a), 而和扫描速度的平方根($V^{1/2}$) 成良好的线性关系(见图 4b). 说明在该条件

下, 1-甲基鸟苷在 GCE 上的电化学氧化过程受扩散控制, 反应物在电极上不吸附或弱吸附.

3.2 循环伏安法

1-甲基鸟苷在玻碳电极上的循环伏安过程(见图 5) 所示, 在 1.16 V 附近有一个氧化峰, 但是还原过程无还原峰出现, 说明电极过程不可逆.

4 结论

本文详细研究了 1-甲基鸟苷在玻碳电极上的电化学氧化行为, 建立了一个微分脉冲溶出伏安法测定体系, 检测线性范围为 $4.0 \times 10^{-7} \sim 1.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$, 最低检测限为 $6.6 \times 10^{-8} \text{ mol/L}$. 该法应用于兔血清及尿样中 1-甲基鸟苷的测定, 结果令人满

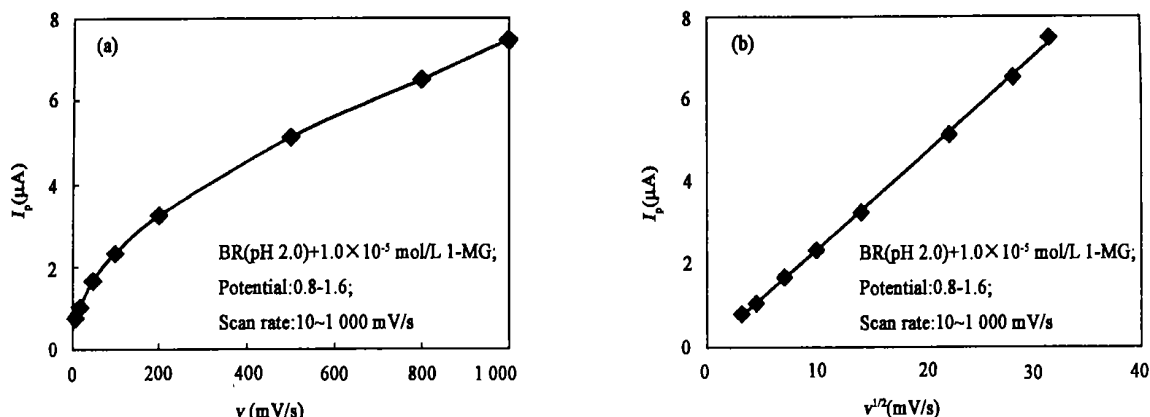


图 4 峰电流和扫描速度的关系

Fig. 4 A the effect of scanrate on peakcurrent of 1-MG

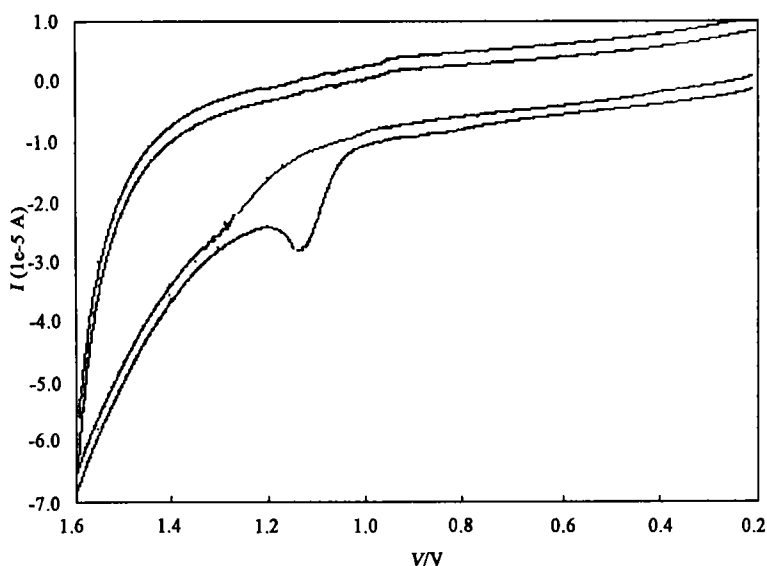


图 5 1-MG 在 GEC 上的 CV 图

Fig. 5 CV voltammogram of 1-MG

意. 此外, 本文还对 1-甲基鸟苷体系的电化学氧化机制进行了初步的研究.

参考文献:

- [1] Zhao R H, Xu G W, Yue B F. Artificial neural network classification based on capillary electrophoresis of urinary nucleosides for the clinical diagnosis of tumors [J]. J Chromatogr A, 1998, 828: 489-496.
- [2] 政育芳, 张云, 刘大渔, 等. 胶束电动力学毛细管色谱法测定尿中核苷[J]. 高等学校化学学报, 2001, 22: 912-915.
- [3] 梅素容, 许国旺, 吴采樱. 人尿中 8-羟基脱氧鸟苷的气相色谱分析方法[J]. 分析化学, 2001, 29: 1 394-1 397.
- [4] Itoh K, Konno T, Sasaki T, *et al.* Relationship of urinary pseudouridine and 1-methyladenosine to acinity of leukemia and lymphoma[J]. Clin Chim Acta, 1992, 206: 181-189.
- [5] Xu G W, Di Stefano C, Liebich H M, *et al.* Reversed-phase high-performance liquid chromatographic investigation of urinary normal and modified nucleosides of cancer patients[J]. J Chromatogr B, 1999, 732: 307-313.
- [6] Liebich H M, Xu G W, Di Stefano C. Capillary electrophoresis of urinary normal and modified nucleoside of cancer patients[J]. Chromatographia, 1997, 45: 396-401.
- [7] 李启隆. 电分析化学[M]. 北京: 北京师范大学出版社, 1995, 240-245.

Differential Pulse Voltammetry Study on 1-Methylguanosine

ZHANG Lan, YANG Juan, CHEN Jiang, CHEN Guo-nan
(Department of Chemistry, Fuzhou University, Fuzhou, Fujian 350002, China)

Abstract: Voltammetric behaviour of 1-Methylguanosine(1-MG) has been investigated at Glassy Carbon Electrode(GCE) by cyclic voltammetry(CV), linear sweep voltammetry(LSV), differential pulse voltammetry(DPV), square wave voltammetry(SWV). In the Britton-Robinson(pH2.0) buffer solution, one well-defined oxidation peak of 1-MG is proportional to the concentration of 1-MG over the range of $4.0 \times 10^{-7} \sim 1.0 \times 10^{-5}$ mol/L. The detection limit is 6.6×10^{-8} mol/L. This method was successfully applied to the analysis of urine samples and serum sample with recoveries 96.0%~102.0%.

Key words: 1-Methylguanosine; modified nucleoside; voltammetry

Classifying number: O657.72

《分析测试技术与仪器》征稿简章

1 文稿要求

- 1.1 题目简洁、明白,并附英文题名及汉语拼音的作者姓名。
- 1.2 数据可靠,论点清楚、准确,字迹工整,文字流畅,16开稿纸打字,一式两份(含原稿一份)。
- 1.3 英文及汉语拼音一律用打字机打印或印刷体书写。英文摘要在16开纸上隔行打印。
- 1.4 文中实验部分,应对使用的仪器型号、生产厂、测试条件和精度、数据的有效值位数、所用试剂的纯度以及实验注意事项等加以说明,能足以使他人重复实验结果。
- 1.5 只选最必须的图、表和照片,插图务必用炭素墨水精绘于图纸上,线条要均匀,不可涂改,污损或着色。在图的背面用铅笔轻述书写图号,正文留出位置,下注中英文图题。表格宽度不得超过34个印刷字符的位置。
- 1.6 结构式不得夹杂于行文中,缩写在第一次出现时均予以注明。
- 1.7 容易混淆的拉丁字母、希腊字母、大小写英文字母,数字0和字母O都要用铅笔加以旁注。
- 1.8 计量单位使用“中华人民共和国国家标准”(GB3100~3102-93)。
- 1.9 参考文献未经发表的请勿引用。

- 1.9.1 期刊的书写格式及标点 作者姓名. 文题名. 刊名, 出版年份, 卷号(期号): 所援引部分或论文的起止页(参照GB7714-87)。

中文例:

凌凤香, 樊立民, 陈立仁, 俞惟乐. 用硅质二醇固定相测定化学驱油体系中聚丙烯酰胺. 分析测试技术与仪器, 1996, 2(1): 9~13.

外文例:

Jungbauer A. Preparative chromatography of biomolecules. J. Chromatogr., 1993, 639(1): 3~16.

- 1.9.2 图书的书写格式及标点符号 著者姓名. 书名. 版本(第一版不著录). 出版地: 出版者, 出版年. 起止页码。

中文例:

竺可桢. 物候学. 北京: 科学出版社, 1973. 1~3.

外文例:

Sanderson R T. Chemical bond and bond energies. New York: Academic Press, 1976. 23~30.

- 1.9.3 参考文献作者不超过3人全部列出,多于3人时一般只列前3人,后加“等”或“et al”,必要时也可全部列出。姓名采用姓前名后的形式,作者之间不用“和”字。

- 1.10 文稿所述研究课题为国家自然科学基金项目或其他重要基金项目,请注明。

2 投稿手续

- 2.1 国内稿件须经本单位保密审查并附有单位介绍信,国外稿件按国际惯例应有投稿人签字。
- 2.2 作者为两人以上,请指定通讯联系人(在姓名右上角加*号),并写清楚通讯地址、邮编。
- 2.3 请给出第一作者的简介。主要内容为:姓名,性别,年龄,学历(或职称、职位),主要从事的研究领域或主要从事的工作。
- 2.4 一稿不能两投,每篇稿件收注册费60元。

3 稿件处理

- 3.1 编辑部一经收到来稿,将及时函告作者,不接受的会尽快退还本人。
- 3.2 需要修改的稿件,将由编辑部抄送审查意见请作者修改。修改稿应附有对审查意见的逐点说明,以便复审。
- 3.3 编辑部根据审稿原则,有权对稿件作必要的修改和删减。
- 3.4 稿件经编辑加工定稿后便不得更改,作者在收到印刷清样后,仔细校订后快件寄回编辑部。
- 3.5 来稿一经发表,即按规定寄付稿酬,并赠送该期期刊两份。
- 3.6 要求作者提供修改稿软盘,用以下编辑及排版软件:中文Word、北大方正书版。若用其它排版软件,请转换成纯文本格式。

来稿请寄:《分析测试技术与仪器》编辑部,地址:甘肃省兰州市天水路342号,E-mail:FXCS@ns.lzb.ac.cn,邮政编码:730000.