

火箭电泳法测血清中载脂蛋白 B 含量

孙雅贤 张连珊

(河北省医学科学院实验医学研究所, 石家庄)

提 要

本文用纯化人血清低密度脂蛋白免疫家兔制得效价为 1:256 的特异抗血清, 并用火箭电泳法检测 116 例正常人血清 ApoB 水平为 $68.51 \pm 1.22 \text{ mg/dl}$, 110 例高脂血症病人血清 ApoB 水平为 $108.51 \pm 1.78 \text{ mg/dl}$ 。两组比较有高度显著性 ($p < 0.01$)。本法为临床检验和基础研究提供了新的途径。

载脂蛋白 B(ApoB) 是运载胆固醇的主要工具, 是致动脉粥样硬化的因素之一^[1,2]。测定血清中 ApoB 含量对于动脉粥样硬化的防治有实用价值。

ApoB 几乎全部存在于低密度脂蛋白(LDL)和极低密度脂蛋白(VLDL)中, 占 LDL 总蛋白量的 95% 以上, 占 VLDL 总蛋白量的 40%^[3,4]。

本文试图建立火箭电泳法测血清中 ApoB 含量的方法, 此法的特点是特异、准确、简便、用血清量少、重复性好、测定样品数量多, 适用于临床。

现将方法及检测 116 例健康人, 110 例高脂血症病人血清中 ApoB 水平报道如下。

试剂和方法

一、试剂、设备

1. 人血清 LDL: 中国医学科学院基础医学研究所供应。蛋白含量为 1.27 mg/ml 。

2. 兔抗人 LDL 抗血清: 自制。效价 1:256。

3. 2% 琼脂糖: 上海东风制药厂出品。以双蒸水配成 2% 溶液。

4. 0.1 mol/L 巴比妥缓冲液 pH8.6: 巴比妥

钠 20.6 g 巴比妥 3.68 g 加蒸馏水至 1000 ml 。

5. DY-W₂ 型电泳仪: 北京试验设备厂生产。

6. 4°C 冰箱或 4°C 冷室。

二、方法

1. 兔抗人 LDL 抗血清的制备: 以人血清 LDL 为抗原, 用淋巴结免疫法免疫青紫蓝雄性家兔。两个月后试效价, 达到要求后颈动脉放血分离血清, 置 -20°C 冰箱保存备用。

2. 用 32 ml 1% 琼脂糖内含 LDL 抗血清 0.1 ml 浇于 $6.5 \times 20 \text{ cm}$ 玻板上, 打直径 3 mm 孔洞, 分别于不同孔洞中加入不同稀释度的 LDL 标准液及 1:5 稀释的检测人血清 $10 \mu\text{l}$, 滤纸搭桥, 置 4°C 处电泳, 20 cm 胶长供应电压 160—170 伏, 电泳 4 小时。电极缓冲液为 0.02 mol/L 巴比妥缓冲液 pH8.6。电泳结束后测量火箭峰高度(由孔上缘至尖端)于标准曲线上查出 ApoB 的含量, 再算出待测血清中 ApoB 的百分含量。

3. 标准曲线: 以不同稀释度 LDL 中 ApoB 浓度为横坐标, 以火箭峰高度为纵坐标制作标准曲线。

4. 正常人: 被检对象来自农村 18—50 岁男女献血员, 经体检未发现疾病者。

5. 高脂血症病人: 被检对象空腹取血化验血脂, 凡查出二项增高, 即胆固醇在 200mg/dl 以上, 甘油三脂在 150mg/dl 以上, β -脂蛋白在 500mg/dl 以上者做为本试验被检对象^[5]。

结 果

一、抗体纯度鉴定

1. 免疫电泳法: 于抗体槽两侧的孔洞中分别加入人血清 LDL 及人全血清, 都分别于 β 位置呈现一条沉淀线, 两条沉淀线相对应。见图 1。

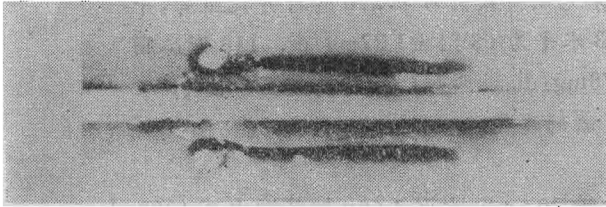


图 1 免疫电泳(氨基黑 10B 染色)
上孔: 人血清 LDL 下孔: 人全血清
中央槽: 兔抗人 LDL 抗血清

2. 免疫双扩散法: 经检测抗原与抗体间只出现一条沉淀线, 见图 2。

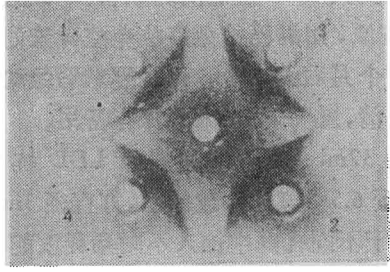


图 2 免疫双扩散(氨基黑 10B 染色)
中央孔: 兔抗人 LDL 抗血清
1、2 孔: 人血清 LDL
3、4 孔: 人全血清

3. 交叉免疫电泳法: LDL 相应位置出现一较大融合沉淀峰, 并跨到 VLDL 位置, 见图 3。

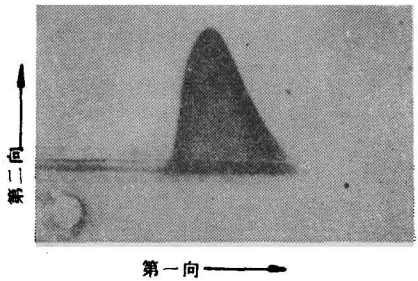


图 3 交叉免疫电泳(氨基黑 10B 染色)

表 1 各标准点溶液的制备

	1	2	3	4
原倍 LDL(μ l)	10	20	30	40
生理盐水(μ l)	190	180	170	160
ApoB 含量 (mg/dl)	6.22	12.45	18.67	24.89

表 2 不同时间各点标准 LDL 火箭高度

标准 LDL	1	2	3	4
3 小时火箭峰高度 (mm)	8.5	14.5	19.0	23.0
4 小时火箭峰高度 (mm)	8.5	14.5	21.0	28.5

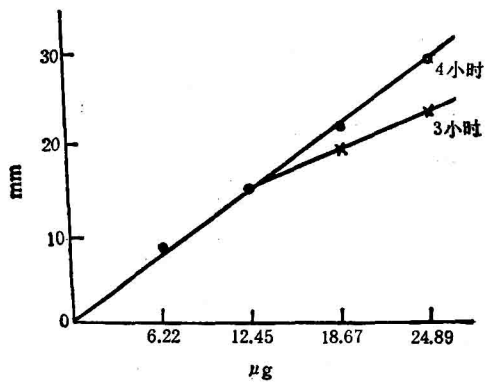


图 4 不同时间标准 LDL 的线性关系
横坐标的单位均乘 0.1

度, 结果表明在本实验条件下, 抗原浓度在 6.22—24.89mg/dl 范围内电泳 4 小时时火箭峰高度与抗原浓度呈正比关系。

三、一致性实验 同一份检测血清在同一实验中同时点三点, 结果一致性很好见表 3。

表 3 检测血清的一致性实验

检测血清	第 1 点	第 2 点	第 3 点	平均值(火箭峰高度 mm)
1	18.5	18.5	18.5	18.5
2	16.0	16.0	16.0	16.0

二、标准 LDL 的线性关系

1. 各标准点溶液的制备见表 1。
 2. 不同稀释度 LDL 所需电泳时间的探索见表 2 及图 4。
- 电泳 3 小时及 4 小时分别测量火箭峰高

四、重复性实验 同一份检测血清在不同实验中同时做四点,结果重复性很好见表 4。

表 4 同一被检血清在两次实验中的结果比较

	标准 LDL 火箭高度 (mm)	检测血清火箭高度 (mm)	血清含 ApoB 量 (mg/dl)
第一次实验	1 8.5	18.5	96.32
	2 14.5	18.5	96.32
	3 21.0	18.5	96.32
	4 28.5	18.5	96.32
	平均	18.5	96.32
第二次实验	1 7.0	16.0	97.08
	2 11.5	16.0	97.08
	3 19.0	16.0	97.08
	4 23.0	16.0	97.08
	平均	16.0	97.08

第 1 次实验: 电压 170 伏, 电流 23 毫安; 第 2 次实验: 电压 160 伏, 电流 20 毫安。

注: 同一检测血清在两次实验中同样操作只是电流强度不同造成火箭峰高度不同, 但每次实验带有标准曲线, 经计算同一样品在两次实验中结果基本一致, 两次实验之差 3.8mg/dl。

五、样品检测结果 116 例正常人血清 ApoB 水平: $68.51 \pm 1.22 \text{mg/dl}$; 110 例高脂血症病人血清 ApoB 水平: $108.51 \pm 1.78 \text{mg/dl}$, 二组比较, $p < 0.01$, 有高度显著性。

讨 论

本文系依据抗原在含有抗体的凝胶中电泳迁移, 并与相应抗体形成特异沉淀峰, 在抗体浓度一定的条件下, 其沉淀峰高度与抗原浓度成正比的原理^[6]开展此项工作的。

由于蛋白质具有抗原性, ApoB 占 LDL 总蛋白量的 95% 以上, 故用人血清 LDL 免疫家兔制备的兔抗人 LDL 抗血清可以看作是抗人 ApoB 的抗血清。虽然有文献报道 LDL 中尚有极少量的 ApoC 和 ApoE; 高密度脂蛋白 (α -脂蛋白) 中也存在 ApoC 及 ApoE。但本实验经交叉免疫电泳验证仅在 β -脂蛋白 (LDL+VLDL) 位置出现可溶性沉淀峰, γ 及 α 位置均无交叉反应, 说明本文制备的抗血清即使含有少量的抗 ApoC 及抗 ApoE 抗体, 由于含量极微, 不影响 ApoB 的免疫定量。

本文报道的 116 例正常人 ApoB 水平略低于用放射免疫法测定的欧洲正常人血清 LDL 蛋白含量^[7]。

由于本方法能客观地反映出被检者血脂水平, 故可用于临床检验和基础研究见图 5。

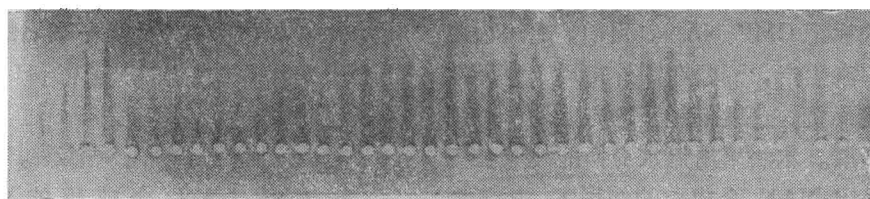


图 5 火箭电泳(氨基黑 10B 染色)

自左向右 1—4 孔: 标准曲线 5—14 孔: 正常人血清 15—末孔: 高脂血症病人血清

参 考 文 献

- [1] Goldstein, J. L. et al.: *Ann. Rev. Biochem.*, 1977, 46, 897.
- [2] Waugh, D. A. et al.: *Journal of Lipid Research*, 1982, 23, 201.
- [3] Schonfeld, G.: *Progress in Cardiovascular Diseases*, 1983, 26(2), 91.
- [4] Calvert, G. D. et al.: *Clin. Chem. Acta.*, 1979, 97,

- [5] 江苏省弹性酶研究临床协作组: 《江苏医药》, 1980, 6, 26.
- [6] N. H. 阿克塞尔森等著: 《定量免疫电泳》, 科学出版社, 北京, 1980, 1.
- [7] Robert, S. Lees.: *Science*, 1970, 169, 493.

[本文于 1987 年 3 月 14 日收到]