

技术与方法

人血清载脂蛋白 AII 的分离纯化及其抗血清的制备

黎 健 蒋 雷 王 抒 李健斋

(卫生部北京老年医学研究所生化室)

提 要

本文应用超速离心、盐酸胍处理、DEAE-Sepharose CL-6B 离子交换柱层析分离纯化人血清载脂蛋白 AII。经等电聚焦电泳、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳和免疫电泳等鉴定,其纯度达到电泳纯和免疫纯。以此载脂蛋白 AII 纯品免疫家兔产生的抗血清,效价较高,特异性强,与载脂蛋白 AI、B、CI、CII、CIII、E 和白蛋白没有交叉反应。

载脂蛋白 (apo) AI、AII 是高密度脂蛋白 (HDL) 的主要组成蛋白,约占 HDL 蛋白质的 90%。apoAII 的功能至今还不十分清楚,除了构成 HDL 颗粒外,可能是肝甘油三酯脂肪酶 (HTGL, hepatic triglyceride lipase) 的激活剂,或有识别 HDL 受体的功能,因此在脂代谢调控中起重要作用。业已证明,血清 apoAII 浓度与发生冠心病的危险性呈负相关^[1,2]。Kottke 指出^[3], apoAI 和 apoAII 测定在判别有无明显冠状动脉病变时,优于血清总胆固醇,甘油三酯和 HDL 胆固醇等指标,因此有实用意义。

制备 apoAII 纯品和其单价高效的抗血清是免疫测定 apoAII 的关键,但国内尚无报道。apoAII 的纯化有一定的难度,主要是 apoAII 不易与 apoAI 分离,而且 apoAII 分子量较小,抗原性弱,不易得到效价较高的抗血清。我们用超速离心、盐酸胍处理和 DEAE-Sepharose CL-6B 柱层析分离纯化人血清载脂蛋白 AII,并获得了效价较高的单价抗血清。

材 料 和 方 法

一、人血清 HDL 的提取

取人血清 400ml 按系列超速离心法分离出 HDL,以 0.001mol/L EDTANa₂ (pH8.0) 液透析 48 小时。

二、盐酸胍处理

向 HDL 液加入固体盐酸胍 (盐酸胍最终浓度为 6mol/L),在 37℃ 水浴放置 3 小时。透析除去盐酸胍。

三、超速离心分离

经盐酸胍处理的 HDL 溶液,用 KBr 调密度至 1.21,182000g 5℃ 离心 20 小时,收集顶端的桔黄色层,即为去除大部分 apoAI 的 HDL 溶液。透析除去 KBr。

四、脱脂

HDL 溶液进行冷冻干燥后,用乙醇:乙醚 (3:1, V:V) 液抽提脱脂二次,再用乙醚洗一次,离心后移去乙醚,沉淀用氮气缓慢吹干,然后用 0.03mol/L Tris-6mol/L 尿素 (pH8.0) 溶液溶解。

五、DEAE-Sepharose CL-6B 柱层析

柱床体积 1.5 × 40cm, DEAE-Sepharose CL-6B 装柱后用 0.03mol/L Tris-6mol/L 尿素 (pH8.0) 溶液平衡。样品约 10ml,上柱后先以 100ml 0.03mol/L Tris-6mol/L 尿素溶液

洗脱,然后用 0—0.15mol/L NaCl (含 0.03mol/L Tris-6mol/L 尿素 pH8.0) 进行梯度洗脱,收集 apoAII 峰,对 0.001mol/L EDTANa₂ (pH8.0) 溶液透析 48 小时,用 Lowry 氏法测蛋白含量,4℃ 保存备用。

六、apoAII 制品的鉴定

1. SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

凝胶浓度为 10%, SDS (Sigma 产品) 浓度为 0.1%, apoAII 制品 50 μ l (4.15 μ g) 与 25 μ l 含 1% β 巯基乙醇的 0.01mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH7.2) 混合,置 60℃ 30 分钟。电泳缓冲液为含 0.1% SDS 的 0.1mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH7.2),电泳后用 0.05% 考马斯亮蓝 R-250 溶液染色。

2. 等电聚焦电泳

凝胶浓度为 6%, Ampholine (军事医学科学院产品) 浓度为 5%。凝胶中加入 6mol/L 尿素。在 LKB 2117MULTIPHORII 等电聚焦电泳仪上进行聚焦,样品量 20 μ l (1.66 μ g),电泳条件: 阴极 1mol/L NaOH, 阳极 1mol/L H₃PO₄, 温度 10℃, 控制功率 1W/cm 板宽,电泳 3 小时。用 12.5% 三氯醋酸固定后以 0.04% 考马斯亮蓝 G250 染色,最后用 30% 乙醇-11% 冰乙酸脱色。以西德 Behring 厂的 apoAII 纯品进行对照。

3. 免疫电泳

用巴比妥缓冲液 (pH8.6) 将琼脂糖配制成 1% 浓度, apoAII 制品加量为 10 μ l (0.83 μ g),电泳后对兔抗人全血清(北京生物制品研究所产品,滴度 1:6000) 做免疫扩散。

4. 与 Boehringer Mannheim 商品羊抗人 apoAII 抗血清进行双向免疫扩散: 琼脂糖浓度 1%, apoAII 制品和 apoAII 抗血清的加量均为 10 μ l。

5. 与本室制备的兔抗人 apoAI 抗血清^[4], apoB 抗血清^[5]及兔抗人血清白蛋白抗血清(北京协和医院内分泌科提供)进行双向免疫扩散。

七、apoAII 抗血清的制备

纯 apoAII 溶液(含 apoAII 1mg) 与等体积福氏完全佐剂研磨至油包水状。在新西兰白

兔双侧腹股沟和双腋下多点皮下注射,每两周加强免疫一次。第八次免疫后的第十天进行颈动脉放血,分离血清,加入防腐剂 (0.1% NaN₃, 0.01% 硫柳汞),置 -20℃ 保存备用。

八、抗血清鉴定

1. 与 apoAI、apoB、apoE、apoCI、CII、CIII (均为本室制备)、人血清白蛋白 (Sigma 产品) 及正常人血清进行双向免疫扩散,鉴定 apoAII 抗血清的特异性。

2. 效价测定: 自制 apoAII 抗血清同时与 Boehringer Mannheim 商品 apoAII 抗血清进行比较。用生理盐水把抗血清系列稀释成 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 然后与人血清进行免疫双扩散。

实验结果

一、apoAII 制品的纯度

1. SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳结果见图 1, 只呈现单一区带, 与 Behring 的 apoAII 纯品一致。

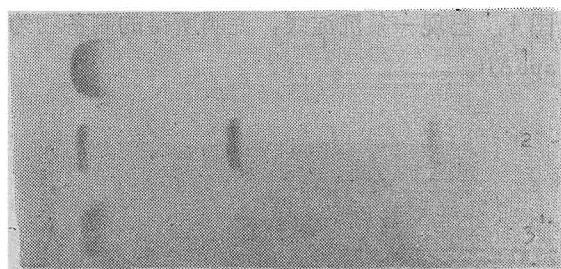


图 1 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱

1. 为 Behring 的 apoAII 纯品 2. 为分子量测定标准物:
(1) 核糖核酸酶 A(13700) (2) 糜蛋白酶原(25000) (3)
卵清蛋白(43000) 3. 为自制的 apoAII

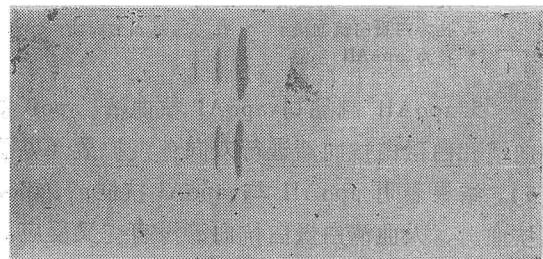


图 2 等电聚焦电泳图谱

1. 为 Behring 的 apoAII 纯品; 2. 为自制的 apoAII

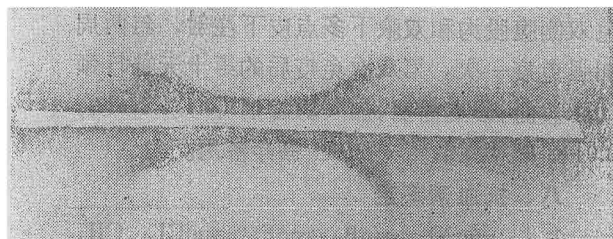


图3 免疫电泳图谱

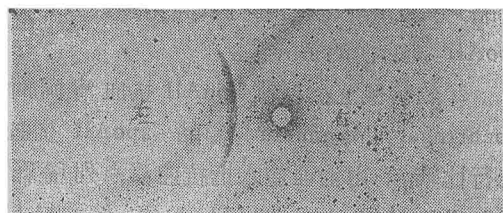


图4 双向免疫扩散图谱

右孔为 apoAII, 左孔为 Boehringer 的 apoAII 抗血清

2. 等电聚焦电泳结果见图2, 结果表明 apoAII 具有多态性, 这与国外报道相符^[6,7]。

3. 免疫电泳结果只出现一条沉淀弧 (见图3)。

4. apoAII 制品与 Boehringer Mannheim 的 apoAII 抗血清进行双向免疫扩散, 结果见图4, 出现一条沉淀线, 说明所得的制备物为 apoAII。

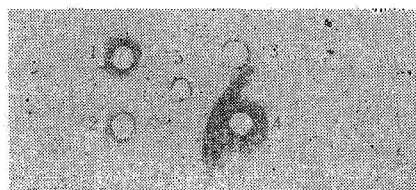


图5 apoAII 与 apoA1、apoB 抗血清、白蛋白抗血清和兔抗人全血清

双向免疫扩散图谱

- 1 孔为 apoA1 抗血清 2 孔为 apoB 抗血清
3 孔为白蛋白抗血清 4 孔为兔抗人全血清
5 孔为 apoAII 制品

5. apoAII 制品与 apoA1 抗血清、apoB 抗血清和白蛋白抗血清进行双向免疫扩散 (见图5)。结果表明 apoAII 与 apoA1 抗血清、apoB 抗血清、人血清白蛋白抗血清没有交叉反应。

二、apoAII 抗血清的鉴定

1. 特异性鉴定: 结果见图6, 表明 apoAII

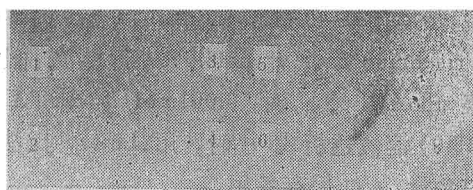


图6 apoAII 抗血清特异性试验结果

中间孔为 apoAII 抗血清

- 周围孔: 1 孔为 apoA1 2 孔为 apoB
3 孔为 apoC1 4 孔为 apoCII
5 孔为 apoCIII 6 孔为 apoE
7 孔为白蛋白 8 孔为 apoAII

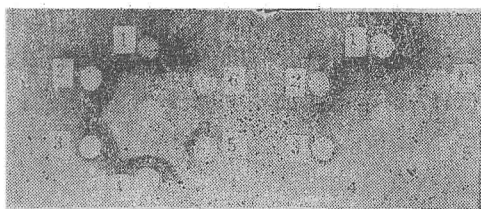


图7 apoAII 抗血清效价测定结果

左为自制 apoAII 抗血清效价测定结果

右为 Boehringer 的 apoAII 抗血清效价测定结果

中间孔为人血清, 周围孔为不同稀释度的抗血清

1 孔—6 孔分别为 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 稀释

抗血清与 apoA1、B、C1、CII、CIII、E 和白蛋白没有交叉反应, 是单价抗血清。

2. 效价测定 (见图7)。我们制备的 apoAII 抗血清效价为 1:32; Boehringer Mannheim 商品 apoAII 抗血清效价为 1:8。

讨 论

关于 apoAII 的分离纯化, 国外文献^[8]中多用凝胶过滤和离子交换柱层析相结合的方法, 但经过一次凝胶过滤或一次离子交换柱层析, 很难得到纯的 apoAII, 制品中往往含有杂蛋白, 尤其是 apoA1。如果先经过一次 Sephadex G200 或 Sephacryl S-200, 然后再过一次 DEAE-cellulose 柱层析, 可以在 apoAII 峰的峰尖部得到较纯的 apoAII, 而峰的后半部仍含有 apoA1, 这样 apoAII 的得量较低, 而且此法较费时。国外已有研究者应用制备型等电聚焦电泳分离 apoAII, 但此法得到的 apoAII 制品仍含有少量的 apoCII 或 apoAIV。我们所用的方法, 是根据 apoAII 在 HDL 颗粒中的

简便快速纯化人血清 α_1 -酸性糖蛋白的方法

陈志毅 薛 侃 吴亦英 赵学海

(蚌埠医学院生化教研室)

提 要

本文采用 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和 CCl_3COOH 沉淀, 及 Cibacron blue F3G-A-Sephadex G-100 凝胶柱层析, 经二步提纯了人血清 α_1 -酸性糖蛋白。PAGE 鉴定, 在阳极端仅显示一条蛋白带。Schiff 氏试剂染色阳性, 证实为糖蛋白。SDS-PAGE 测得其分子量为 45000。免疫电泳结果表明, 纯化的 α_1 -酸性糖蛋白与兔抗人全血清及兔抗人 α_1 -酸性糖蛋白均呈现单一沉淀弧。氨基酸组成测定亦与文献报告的结果基本一致。本方法简便、省时。

人血清 α_1 -酸性糖蛋白 (简称 α_1 -AGP) 是由肝脏合成的一种急性相反应蛋白。恶性肿瘤或急性炎症时, α_1 -AGP 在血液中的浓度常有明显增高^[1-3]。已表明 α_1 -AGP 能明显抑制人外周血淋巴细胞促进有丝分裂原的增生反应及混合淋巴细胞反应^[4], 但其免疫学作用机理仍不清楚。

血清 α_1 -AGP 的制备一般多采用乙醇或硫酸铵沉淀后, 用离子交换层析等进一步纯化^[5,6]。但由于血清中大量存在的白蛋白的干扰, 往往给纯化工作带来一定的困难。本文报告利用自己制备的 Cibacron blue F3G-A 染料偶联的 Sephadex G-100 凝胶, 经二步纯化得到免疫电泳纯的人血清 α_1 -AGP。本方法简便、快速。

结合力比 apoA1 大, apoA1 在 HDL 中结合不稳定这一性质, 用盐酸胍处理 HDL, 使 apoA1 从 HDL 中游离出来, 再经过一次 DEAE-Sephacrose CL-6B 柱就可得到 apoAII。经等电聚焦电泳、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳、免疫电泳等鉴定, apoAII 制品的纯度达到电泳纯和免疫纯。另外, 此法便于同时制备 apoA1 和 apoAII。

根据 apoAII 分子量较小, 抗原性弱等特点, 我们通过调整免疫佐剂中石蜡油和羊毛脂的比例, 以及适当加大抗原量, 得到效价较高的抗血清。此外, 用火箭电泳法对自制 apoAII 抗血清和 Boehringer 的 apoAII 抗血清进行比较, 结果表明, 用本室自制 apoAII 抗血清, 抗血清用量少, 火箭峰清晰, 背景干净, 而 Boehr-

inger 的 apoAII 抗血清用量大, 形成的火箭峰从加样孔处开始呈烟囱状, 不形成峰尖, 琼脂糖板的背景深, 说明自制的抗血清优于 Boehringer 的抗血清。

参 考 文 献

- [1] Fager, G. et al.: *Arteriosclerosis*, 1981, 1, 273.
- [2] Miller, NE. et al.: *Amer. Heart J.*, 1987, 113, 589.
- [3] Kottke, BA. et al.: *Mayo Clinic Proc.*, 1986, 61, 313.
- [4] 胡师学等:《中华医学检验杂志》, 1986, 9, 143.
- [5] 黎 健等:《中华医学检验杂志》, 1987, 10, 198.
- [6] Lackner, KJ. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1985, 260, 703.
- [7] Schmitz, G. et al.: *J. Lip. Res.*, 1983, 24, 1021.
- [8] Mills, GL. et al.: *A guidebook to lipoprotein technique*, Amsterdam: Elsevier, 1984, 384.

[本文于 1988 年 6 月 6 日收到]