

参 考 文 献

- 1 莫简主编. 医用自由基生物学导论. 北京: 人民卫生出版社, 1989: 21—25
- 2 胡天喜等编著. 发光分析与医学. 上海: 华东师范大学出版社, 1990: 48—67

- 3 Rowley D A *et al.* *Arch Biochem Biophys*, 1983; 225:279
- 4 王成莲等. 生物化学与生物物理进展, 1989;16(6): 473
- 5 English D K. In: Van Dyke K *et al.* eds, *Cellular Chemiluminescence*. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1987; III: 153—166

人血浆载脂蛋白 E 的分离提纯*

解用虹 徐秀双** 郭 刚 郭善一 王维兆

(天津医学院生物化学教研室, 天津 300070)

提 要

利用仅 2.5h 的不连续密度梯度超速离心, 可自人血浆分离获得纯净的极低密度脂蛋白 (VLDL)。VLDL 脱脂后, 其可溶成分经 Heparin-Sepharose CL-6B 亲和层析柱, 可分为低盐洗脱峰 I 和高盐洗脱峰 II。峰 II 经 SDS-PAGE 鉴定为单一染色带, 测定其分子量为 33 900。此即为纯净的人血浆载脂蛋白 E, 载脂蛋白 E 的分离提纯为制备其单克隆抗体和进行血浆浓度及表型测定提供了有利条件。

关键词 载脂蛋白 E, 极低密度脂蛋白, 超速离心, 亲和层析

载脂蛋白 E (apolipoprotein E, apo E) 是人血浆主要载脂蛋白成分之一。其由位于第十九染色体同一位点上的三个等位基因 ϵ_2 , ϵ_3 和 ϵ_4 编码, 人群中存在着三种异构体和 6 种不同的表型。不同异构体受体结合活性差异明显, 因此 apoE 是影响机体血脂水平的重要遗传因子。不同民族血脂水平的差异与 apo E 等位基因频率分布密切相关; 同一民族具有不同等位基因人群血脂水平及动脉粥样硬化的易患性也存在显著性差异^[1-3]。

apoE 参与了中间密度脂蛋白 (IDL) 向低密度脂蛋白 (LDL) 的转变, 影响和决定着 LDL 的代谢。apoE 缺乏是一种遗传性疾病, 患者血浆中 apoE 的浓度不足正常人的 1%。该病患者具有早发的心血管疾病, 结节-皮疹黄色瘤和 III 型高脂蛋白血症等典型的临床特征^[4]。

apoE 基因型及其血浆水平测定在高脂蛋

白血症和动脉粥样硬化发病机理探讨及临床应用上均有重要意义。血浆蛋白成分复杂, apo E 含量又较低, 一般仅为 3—5 mg/dl。利用单克隆抗体特异性强, 结构单一, 来源充足等特点, 建立相应的免疫学方法是测定 apo E 表型和含量的主要途径。抗原的分离提纯是抗体制备的首要工作, 本文报告人血浆 apo E 的分离提纯。

1 材料与方 法

1.1 人血 VLDL 的分离提纯

人血采自高甘油三酯献血员, 常规离心分离血浆。每 100 ml 血浆加入 KBr 25.0 g, 充分混匀, 此时其密度为 1.20 g/ml。VLDL 的分离提纯参照本室方法修改进行^[5]: 在 Be-

* 国家自然科学基金资助课题。

** 1985 级八年制学生。

收稿日期: 1990-12-24 修回日期: 1991-04-13

ckman Ti70 转头离心管中依次加入蒸馏水 13 ml 和已调密度为 1.20 g/ml 的血浆 23 ml。用 Beckman L8-60M 超速离心机离心, 55000 r/min, 10°C, 2.5h。离心停止后, 收集顶层乳状液。该液经琼脂糖凝胶电泳鉴定为纯净的 VLDL。

1.2 VLDL 的脱脂

收集到的 VLDL 放入透析袋, 在 4°C 用 30% 的聚乙二醇 20000 (日本进口分装) 透析浓缩至原体积的 1/4—1/3。接着用 0.01% EDTA (pH 7.4) 液透析。所得浓缩 VLDL 依 Scanu^[6] 的方法脱脂: 即先用 3:1 (V/V) 无水乙醇/无水乙醚脱脂, 继用无水乙醚脱脂。每次脱脂后均经高速低温离心弃去上清。最后沉淀用含 10 mmol/L Tris-HCl, 6mol/L 尿素, 50 mmol/L NaCl (pH 7.5) 的缓冲液溶解。37°C 保温 2h 后室温离心, 所得上清液即为可溶性的 apo VLDL。

1.3 apo E 的亲层析分离

亲和层析分离参照 Shelburne 等^[7]方法稍加修改进行。Heparin-Sepharose CL-6B (Pharmacia) 经 10 mmol/L Tris-HCl, 6mol/L 尿素, 50 mmol/L NaCl (pH 7.5) 缓冲液溶胀处理后装入 1.2 cm × 15cm 层析柱。将上述可溶性 apo VLDL 上柱后, 用平衡溶液洗脱。待出现完整的第一洗脱峰后, 换用含 600 mmol/L NaCl 的上述缓冲液洗脱。出现很尖的第二洗脱峰, 分别收集第一峰和第二峰。

1.4 apo E 的鉴定

SDS-PAGE 依照 Weber^[8] 的方法进行。凝胶 T 为 7.5%, C 为 2.6%。并根据已知分子量蛋白质 (Sigma) 及其相应迁移率绘制的标准曲线计算 apo E 的分子量。

2 结果与讨论

血浆中 apo E 含量与甘油三酯水平呈正相关。因此我们选用了高甘油三酯血样。apo E 主要存在于 VLDL, 故 apo E 分离提纯的首要工作是获得较大量纯净的 VLDL。国外分离 VLDL 一般多采用 Havel 等^[9]介绍的单

一密度序列超速离心的方法, 这需要至少 18—24h 的超速离心。为适应分离少量血浆 VLDL 进行 apo E 表型测定的要求, 我们曾建立了不连续密度梯度超速离心的方法。仅 2h 的超速离心就可获得纯净的 VLDL, 并成功地进行了 apo E 表型测定的研究^[1]。为制备较大量的 VLDL, 我们对原方法做了适当修改: 首先选用容量较大的 Ti 70 转头, 其次简化梯度组成, 增加了离心的样品量, 每次离心血浆量可达近 200 ml。2.5h 的超速离心结果如图 1。顶层乳状液为 VLDL, 与其下面桔黄色的 LDL 分界清楚。如此获得的 VLDL 经琼脂糖凝胶电泳后用氨基黑 10 B 和油红 “O” 染色均只显示单一染色带, 表明是纯净的 VLDL。

为减少 VLDL 中水的含量和由此产生的脱脂时 apo E 的损失, 我们对不连续密度梯度超速离心后获得的 VLDL 经过聚乙二醇 20000 透析浓缩处理; 为消除样品中可能存在的 KBr 对以后层析样品盐浓度的影响, 对浓缩样品又用 0.01% 的 EDTA 进行了彻底透析。脱脂和离心均在 -20°C 低温下进行, 以减少 apo E 的溶解和丢失。

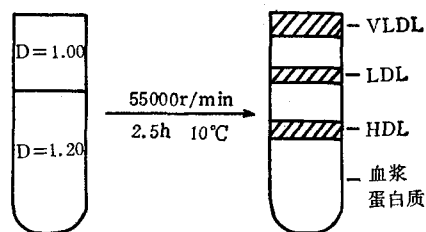


图 1 人血浆 VLDL 不连续密度梯度超速离心示意图

利用 Heparin-Sepharose CL-6B 分离提纯 apo E 的结果如图 2。第一峰为未与肝素结合的蛋白质成分; 在换用含 600 mmol/L NaCl 的洗脱液后, 可出现明显的第二峰, 此即为 apo E。峰 I 和峰 II 的 SDS-PAGE 结果如图 3。根据图 2 和图 3 可见, apo E 不仅与 VLDL 中的其它蛋白成分得到了很好的分离, 而且所有的 apo E 均出现在第二峰中。

VLDL 中除含有 apo E 外, 尚含有 apo

B, apo A_I 及 apo C_s 等。其中 apo A_I 含有 243 个氨基酸残基, 分子量为 28000, 与 apo E 十分接近。采用一般的凝胶排阻层析较难分离 apo E 和 apo A_I。文献报告若用 Sephacryl 需要高达 3 米的层析柱, 不仅费时费力, 并且所得样品也被极大地稀释^[10]。利用 apo E 富含

其中之一是在 142—147 氨基酸残基之间。该区域的一级结构为 Arg-Lys-Leu-Arg-Lys-Arg, 其中五个为碱性氨基酸。根据 ¹²⁵I-apo E₃ 的分析, 其与 Heparin-Sepharose 的 K_d 值为 6.2×10^{-7} mol/L, 最大结合容量为 29.2 μ g/10 mg 湿胶。VLDL 中的 apo B 虽然也能和肝素结合, 但在 VLDL 脱脂以后, apo B 即使在高浓度的尿素溶液中也极难溶解。样品上柱前首先进行离心分离并弃去沉淀的意义就在于此。

已知分子量标准蛋白和 apo E 的 SDS-PAGE 图谱如图 4。根据依已知分子量标准蛋白和其相应迁移率绘制的标准曲线, 计算 apo E 的分子量为 33 900。此值与 Rall 等^[12]根据 apo E 完全氨基酸序列计算的分子量 34 145 十分接近。证实所获得的峰 II 蛋白质组分确系纯净的 apo E。根据我们的实验条件, 一次层析可获得纯净的 apo E 4—5 mg, 最高浓度可达 0.9 mg/ml。较大量纯净 apo E 的分离提纯, 为制备单克隆抗体提供了有利条件, 该项工作正在进行中。

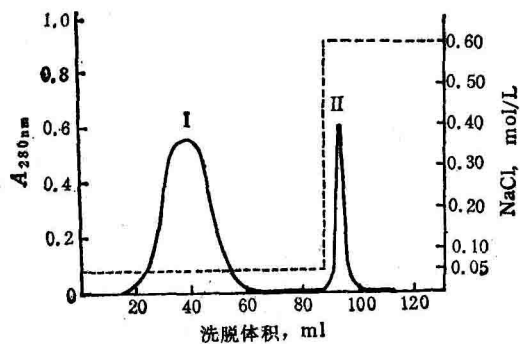


图 2 人可溶性 apo VLDL 的 Heparin-Sepharose CL-6B 亲和柱层析

— A_{280nm} ; ---- NaCl mol/L

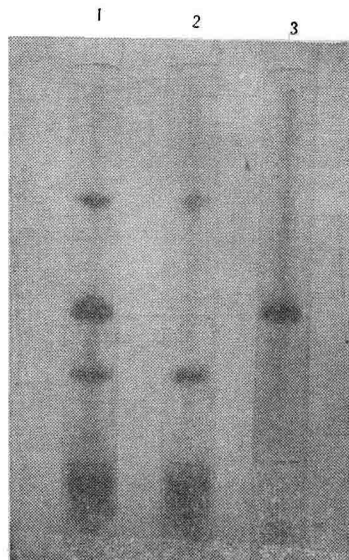


图 3 亲和柱层析分离组分的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱

1. 可溶性 apo VLDL; 2. 未结合组分(峰 I); 3. 结合组分(峰 II)

碱性氨基酸, 可与带负电荷的肝素相互作用的特特点, 采用 Heparin-Sepharose 亲和层析分离提纯 apo E 则是较理想的手段。Weisgraber 等^[11]发现, 在 apo E 上有多个肝素结合位点,

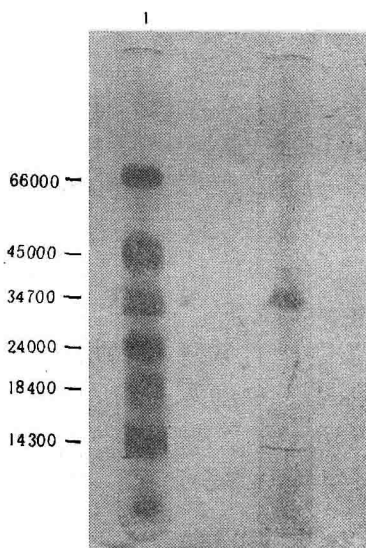


图 4 已知分子量标准蛋白与 apo E 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱

1. 已知分子量标准蛋白 (Sigma) 2. apo E

本工作承蒙中国医学科学院基础医学研究所王克勤教授悉心指导和大力支持, 谨致谢意。

参 考 文 献

- 1 解用虹,王克勤. 生理科学进展, 1985; 16: 136
- 2 Utermann G. *Am Heart J*, 1987; 113: 433
- 3 解用虹,郭善一,吴茹莲等,中华医学杂志, 1989; 69: 585
- 4 Gabelli C, Gregg R E, Zech L A *et al. J Lipid Res*, 1986; 27: 326
- 5 解用虹,何锦林,王克勤,生物化学与生物物理学报, 1987; 19: 272
- 6 Scanu A M, Edelstein C. *Anal Biochem*, 1971; 44: 576
- 7 Shelburne F A, Quarfordt S H. *J Clin Invest*, 1977; 60: 944
- 8 Weber K, Osborn M. *J Biol Chem*, 1969; 244: 4406
- 9 Havel R J, Eder H A, Bregdon J H. *J Clin Invest* 1955; 34: 1345
- 10 Rall Jr S C, Weisgraber K H, Mahley R W. *Methods in Enzymology*, 1986; 128: 273
- 11 Weisgreber K H, Stanley Jr C R, Mahley R W *et al. J Biol Chem*, 1986; 261: 2068
- 12 Rall Jr S C, Weisgraber K H, Mahley R W. *J Biol Chem*, 1982; 257: 4171

三标记参入法及其在硒对淋巴细胞代谢影响研究中的应用

原 瑜*

(新乡医学院核医学教研室)

贾鹏翔 王德全

(西安医科大学核医学研究室, 西安 710061)

提 要

分别以 ^3H -UR, ^{14}C -Leu, ^{125}I -UdR 为前体, 采用三标记参入方法, 更严格地在同一样品中同时观察了淋巴细胞染硒前后 DNA, RNA, 蛋白质的合成及变化。结果表明该方法可行, 且显著提高了实验效率; 三种受试硒化合物在 10^{-8} — 10^{-4} mol/L 浓度范围内对 DNA, RNA, 蛋白质合成均具有双相性影响, 在中毒浓度时, 三种硒化合物的毒性顺序为: 亚硒酸钠 > 硒酸钠 > 硒蛋氨酸。

关键词 ^3H , ^{14}C , ^{125}I 三标记参入法, 硒淋巴细胞, DNA, RNA, 蛋白质

以往多采用单标记或双标记的方法研究观察细胞的 DNA, RNA, 蛋白质的合成及其变化^[1-3]。本实验在原瑜等^[4]建立的 ^3H , ^{14}C , ^{125}I 三标记测量及淬灭校正方法的基础上, 分别用 ^3H , ^{14}C , ^{125}I 标记参入 DNA, RNA, 蛋白质的前体, 采用三标记参入方法, 更严格地同时在同一份标本中观察研究了细胞染硒前后三种生物大分子的合成及影响规律。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂 亚硒酸钠 ($\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), 硒酸钠 ($\text{Na}_2\text{SeO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$), 化学纯, 北京化工厂产品; 硒蛋氨酸, 分析纯, Sigma 公司产品; PHA, 重庆医学检验研究所产品; 淋巴细胞分离液, 上海试剂二厂生产。

1.2 放射性核素标记物 ^3H -尿苷 (^3H -UR), 比强度 18 Ci/mmol, 放化纯度 > 95%; ^{125}I -脱氧尿嘧啶核苷 (^{125}I -UdR), 放化纯度 > 95%, 放射性浓度 669 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$, 以上产品均由中国科学院原子能研究院生产。 ^{14}C -亮氨酸 (^{14}C -Leu), 放射性浓度为 140 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$, 中国医科院放射医学研究所生产。

1.3 培养基 1.1% RPMI 1640 (日本), 内含 20% 灭活小牛血清。

1.4 闪烁液 PPO-POPOP-二甲苯闪烁液, 加助溶剂乙二醇乙醚, 每瓶用量 5 ml。

1.5 主要仪器 LS-9000 型液闪谱仪 (Beckman), Gamma 5500 γ 闪烁计数器 (Be-

* 现通讯地址: 北京协和医院核医学部, 北京 100730

收稿日期: 1991-01-07 修回日期 1991-07-31