

较好的结果.

图 3 给出了 Boehmite 溶胶的 SAXS 谱. 与探测器改进前测得的该类溶液样品的 SAXS 信号相比统计误差明显减小, 且测量时间也缩短了.

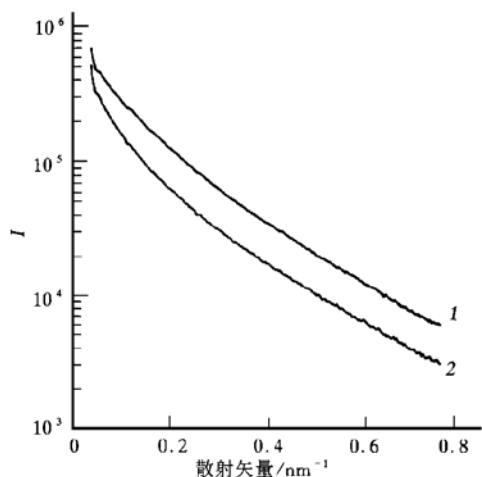


图 3 1 mol/L Boehmite 溶胶的 SAXS 谱

1: 0.09 mol/L $[H^+]$; 2: 0.20 mol/L $[H^+]$.

参 考 文 献

- 1 Glatter O, Kratky O. Small Angle X-ray Scattering. London: Academic Press, 1982. 3~12
- 2 董宝中, 生文君, 张志杰等. 同步辐射小角散射实验站介绍. 高能物理与核物理, 1995, 19 (3): 284~288

Improvement of the Small Angle X-ray Scattering Station. SHENG Wenjun, YANG Henglin, ZHANG Zhijie, DONG Baozhong (*Institute of High Energy Physics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China*).

Abstract Instead of the NaI scintillation counter used before, a position sensitive detector was used with the position precision 100 μm and the effective working area 50 mm $\times$ 10 mm. Good SAXS spectrum of liquid samples that can not be measured before was got. The statistical error was decreased and the total time of experiments was shortened.

Key words small angle X-ray scattering, position sensitive detector, synchrotron radiation

人血浆脂蛋白 B: E 的测定*

解用虹

(天津医科大学生物化学教研室, 天津 300070)

郭 刚

(天津医科大学代谢病防治中心, 天津 300070)

摘要 用纯化的羊抗人载脂蛋白 B 抗体包被 96 孔微量滴定板, 与样品保温后, 加入辣根过氧化物酶标记的羊抗人载脂蛋白 E 纯化抗体, 最后用邻苯二胺底物显色. 与同时进行的标准物比较, 可测定样品中含有载脂蛋白 B 脂蛋白中载脂蛋白 E (简称 LpB: E) 的含量. 用建立的方法对 120 例血样进行了 LpB: E 测定, 并对所得结果进行了简要讨论.

关键词 脂蛋白, 载脂蛋白, 酶联免疫吸附测定

血浆脂蛋白依其密度可分为乳糜微粒 (CM)、极低密度脂蛋白 (VLDL)、低密度脂蛋白 (LDL) 和高密度脂蛋白 (HDL) 四大类. 许多研究已经证实, 任何一类血浆脂蛋白在化学组成和结构功能上都是不均一的. 在脂

蛋白的众多组成中, 载脂蛋白 (apolipoprotein, apo) 是决定脂蛋白结构、功能和代谢的

* 卫生部及天津市科委科学基金资助课题.

收稿日期: 1996-04-28, 修回日期: 1996-09-20

核心组分, 依所含载脂蛋白对脂蛋白进行分类的建议已提出多年. 与此同时, 许多载脂蛋白的免疫学测定方法, 特别是酶联免疫吸附测定方法 (ELISA) 已相继建立并已逐步应用于临床^[1]. 不同脂蛋白中的载脂蛋白是相互作用和影响的, 同一脂蛋白中的不同载脂蛋白也是相互作用和影响的. 例如, VLDL 中载脂蛋白 C 的存在, 不仅影响其中载脂蛋白 B 的降解, 而且也影响其中载脂蛋白 E 与相应受体的结合^[2]. 传统的载脂蛋白免疫学测定方法只能测定样品中某一载脂蛋白的总量, 完全没有考虑不同载脂蛋白间的相互作用. 近年来建立和发展的双点 ELISA (two site ELISA) 新方法, 使用两种不同载脂蛋白的抗体分别作为包被抗体和酶标抗体, 可以定量地测定同时含有该两种载脂蛋白的脂蛋白的量^[3,4]. 本文介绍测定人血浆含载脂蛋白 B 脂蛋白中载脂蛋白 E 含量的新方法.

1 材料和方法

1.1 羊抗人 apo B 和 apo E 抗体的制备纯化

抽取空腹过夜献血员的静脉血并离心分离血浆. 依本室常规方法超速离心制备人血 VLDL 和 LDL. VLDL 经用醇/醚低温脱脂后, 选用 Heparin-Sephrose CL-6B (Pharmacia) 亲和层析分离纯化 apoE^[5], 分离获得的 LDL 进一步超速离心获得密度为 1.030 ~ 1.050 g/ml 的 LDL, 并以此作为 apo B 的免疫原^[6]. 用上述纯化的 apo B 和 apo E 常规免疫山羊, 得到羊抗人 apo B 和 apo E 的抗血清, 用免疫双扩散检查抗体的有无和滴度.

羊抗人 apo B 或 apo E 抗血清首先相继用正辛酸^[7]和硫酸铵^[8]沉淀法初步纯化相应抗体, 接着再用 Protein G (Pharmacia) 亲和层析进一步纯化. 纯化的抗体用 SDS-PAGE 鉴定纯度, 与同时电泳的标准分子质量蛋白比较计算相对分子质量. 用常规的 ELISA 方法确定抗体的反应特异性. 纯化抗体的浓度用分光光度法测定, 当 IgG 浓度为 1 g/L 时, $A_{280} = 1.44$.

纯化的羊抗人 apo E 抗体依 Hurn^[9]的方法与辣根过氧化物酶 (HRPO, RZ > 3.0, Boehringer Mannheim) 进行共价键交联. 酶联抗体溶液与等体积甘油混合后分装置-20℃冰箱保存备用.

1.2 人血浆脂蛋白 B:E 标准的制备

依产品说明书将上述 Protein G 纯化的羊抗人 apo B 抗体与 CNBr-activated Sepharose 4B (Pharmacia) 进行共价交联, 获得羊抗人 apo B 抗体-Sepharose 4B 亲和层析柱. 将经 0.45 μm 超滤膜滤过的人血浆在 4℃ 反复慢速循环经过上述亲和层析柱过夜. 在用 10 个床体积的 100 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 6.8) 进行预洗脱后, 继用 100 mmol/L 的甘氨酸缓冲液 (pH 2.8) 洗脱结合的含 apo B 的脂蛋白. 收集的部分用 1/20 体积的 1.0 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 8.0) 中和^[10]. 所收集的结合脂蛋白组分用 75 mmol/L 的 PBS (pH 7.4) 彻底透析, 并分别测定其 apo B 和 apo E 浓度. 如此制备的脂蛋白溶液即为脂蛋白 B:E 的原始标准, 利用它可以测定和分装混合血浆为工作标准.

1.3 脂蛋白 B:E 测定方法的建立

脂蛋白 B:E 测定方法的建立参照 Kandoussi^[3]脂蛋白 E:B 测定方法修改建立.

1.3.1 用纯化的羊抗人 apo B 抗体 100 μl (5 mg/L) 包被 96 孔板 (Corning), 并置 4℃ 冰箱过夜.

1.3.2 用封闭液 (含 0.5% BSA 的 PBS 液) 冲洗板两次后, 再用 150 μl 封闭液在 37℃ 保温 30 min.

1.3.3 用冲洗液 (含 0.5% BSA 和 0.1% 吐温 20 的 PBS) 冲洗后, 然后在对照孔、标准孔和样品孔分别加入 100 μl 的冲洗液、标准液和样品液. 37℃ 保温 2 h.

1.3.4 用冲洗液冲洗后, 各孔均加入 100 μl 的辣根过氧化物酶标记的羊抗人 apo E 纯化抗体稀释液, 并在 37℃ 保温 2 h.

1.3.5 用冲洗液冲洗后, 每孔均加入 160 μl 的邻苯二胺底物反应液 (400 mg/L), 室温下避光保存大约 30 min.

1.3.6 适时加入 40 μ l 的 2.5 mol/L 硫酸溶液终止反应, 并在酶标仪上测定 490 nm 的吸光值.

1.3.7 根据依标准液绘制的标准曲线和未知样品的吸光值计算待测样品的脂蛋白 B: E 浓度, 并依样品的稀释倍数推算原始样品的浓度.

1.4 样品测定

从临床生化实验室随机收集 120 份血脂测定血浆样品, 其血浆总胆固醇 (TC) 和甘油三酯 (TG) 已用酶学方法测定. 分别用传统的 ELISA 测定其 apo B 和 apo E 的浓度, 用本文建立的方法测定脂蛋白 B: E 的浓度.

2 结 果

2.1 抗体纯度

用 Protein G 亲和层析纯化获得的抗体在 SDS-PAGE 图谱上仅显示为二条清晰的染色带, 根据标准分子质量-电泳迁移率所绘标准曲线计算其相对分子质量分别为 27 000 和 54 000, 相当于 IgG 的轻链和重链, 说明获得的为纯净的抗体.

2.2 抗体特异性

用纯化的人 LDL 和 apo E (5 mg/L) 分别包被 ELISA 板. 经保温冲洗后, 加入纯化的羊抗人 apo B 或羊抗人 apo E 抗体, 继之再分别加入辣根过氧化物酶标记的兔抗羊 IgG 抗体, 最后用邻苯二胺底物显色. 羊抗人 apo B 抗体仅与 LDL 反应显色, 与 apo E 不反应显色; 羊抗人 apo E 抗体仅与 apo E 反应显色, 与 LDL 不反应显色. 说明二者均为特异性抗体, 彼此无交叉反应.

2.3 优化脂蛋白 B: E 测定条件

2.3.1 抗体包被浓度: 在建立测定 apo B 的 ELISA 方法时, 我们根据抗体包被饱和曲线, 确定抗体的饱和浓度为 4 mg/L. 我们选用 5 mg/L 的纯化羊抗人 apo B 抗体作为包被抗体浓度, 保证了抗体与酶标板的最大结合. 在此条件下, 样品中的 apo B 浓度高达 1.2 mg/L 时仍能定量结合.

2.3.2 样品稀释: 综合考虑包被 ELISA 板的结合容量、最大提高测定结果精确度和操作简便易行等因素, 当待测样品 apo B 浓度大于 1.0 g/L 时, 样品 1: 2 000 倍稀释; 若待测样品的 apo B 浓度小于 1.0 g/L 时, 样品 1: 1 000 倍稀释. 如此稀释的待测样品中的 apo B 能保证与包被抗体的定量结合.

2.3.3 标准曲线: 根据预实验有关测定范围、酶标抗体浓度和显色时间的优化组合, 筛选确定标准曲线测定区间为 2.5~40 μ g/L. 标准曲线如图 1 所示.

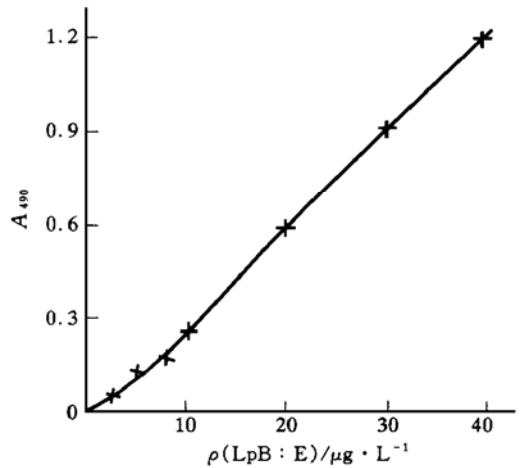


图 1 ELISA 测 LpB: E 标准曲线图

依文中所述测定方法, 加入七个不同浓度的标准物溶液, 以标准物溶液浓度 (LpB: E μ g/L) 对其相应的 A_{490} 作图, 每点均为双孔的平均值.

2.3.4 测定重复性: 对高、低二个样品进行重复测定, 高浓度样品 (LpB: E 为 23.7 mg/L) 批内变异系数 (CV) 为 3.36% ($n=22$), 批间变异系数为 6.28% ($n=5$); 低浓度样品 (LpB: E 为 11.1 mg/L) 的批内和批间变异系数分别为 4.25% 和 12.1%.

2.4 随机人群测定结果

对随机收集的 120 例人血浆 LpB: E 测定结果为 (19.2 ± 7.4) mg/L ($\bar{x} \pm s$). 其中 61 例血脂正常组 ($TC \leq 5.72$ mmol/L 和 $TG \leq 1.65$ mmol/L), LpB: E 浓度为 (15.9 ± 5.3) mg/L; 其余 59 例血脂异常组, LpB: E

浓度为 (22.6 ± 7.7) mg/L.

3 讨 论

利用 ELISA 测定 LpB: E 的关键之一是标准品的制备. 我们利用抗体亲和层析柱技术, 从血浆中获得了含 apo B 的脂蛋白. 这些脂蛋白既包括了以 apo B 为唯一载脂蛋白的“单脂蛋白”, 也包括了同时含有 apo B 和其他载脂蛋白的“复合脂蛋白”. 它们又可根据是否同时含有 apo E 分为两部分: 那些不含 apo E 的部分虽能与包被抗体结合, 但不能与实验中的酶标抗体结合, 故不干扰测定反应; 那些同时含有 apo E 的部分既能与固相化抗体结合, 又能与酶标抗体结合, 这就是 LpB: E. 其含量与产物颜色呈正相关. 至于那些虽含 apo E 但不含 apo B 的脂蛋白由于不可能结合于 apo B 抗体亲和层析柱, 故也不会干扰其后 apo E 的定量. 利用常规 ELISA 方法定量制备物中 apo E 的浓度, 实际上就是 LpB: E 的浓度.

在 LpB: E 的实际测定中, 样品中的 LpB: E 是通过其自身的 apo B 结合于包被抗体的, 因而 apo B 的结合容量是必须考虑的重要问题. 除了 LpB: E 外, 任何其他含 apo B 的脂蛋白均会竞争地结合于包被抗体. 因此, 样品中 apo B 的总量是决定 LpB: E 定量结合的关键. 我们首先选用超饱和的抗体包被浓度, 保证了包被抗体的最大结合量; 又根据样品中 apo B 的总浓度决定样品的稀释倍数, 保证了样品中所有 apo B 的定量结合, 同时也充分地考虑到适当提高待测样品中 LpB: E 的浓度, 以提高测定的精确度.

根据我们对 120 例随机收集样品的测定结果, 人血浆 LpB: E 的平均浓度为 (19.2 ± 7.4) mg/L. 其中 59 例血脂异常组的数值明显地高于血脂正常组, 分别为 (22.6 ± 7.7) mg/L 和 (15.9 ± 5.3) mg/L. 两组相应数值具有统计学显著性差异 ($P < 0.001$), 说明血脂水平是影响 LpB: E 含量的重要因素. 另外, 血脂正常组和血脂异常组中 LpB: E 占其总 apo E 的百分比十分接近, 分别为

$53.26\% \pm 8.69\%$ 和 $53.19\% \pm 8.13\%$ ($\bar{x} \pm s$). 血脂水平与 LpB: E 的内在联系尚需更多样品的测定和进一步的分析.

几乎任何一类脂蛋白均含有不止一种载脂蛋白, 而任何一种载脂蛋白又多存在于不止一类脂蛋白中. 这种脂蛋白与载脂蛋白之间的复杂关系决定了脂蛋白结构、功能和代谢的不均一性. 根据我们的测定结果, 人血浆中的 apo E 一半以上存在于含 apo B 的脂蛋白中, 主要是 VLDL 和 LDL; 另不足一半存在于不含 apo B 的脂蛋白中, 主要是 HDL. 这两种 apo E 具有不同的代谢和生理功能, 传统的载脂蛋白免疫学测定方法不能区分上述两种不同的 apo E. 而本文建立方法则可完成两种不同 apo E 的定量测定. 若能同时进行样品中 LpE: B 的测定, 结合 apo B 和 apo E 的分子质量, 我们就可估算脂蛋白中这两种载脂蛋白的分子数比. 同理, 我们也可以测定其他任何两种载脂蛋白的组合, 如 LpB: C III, LpC III: B, LpB: A I 等等. 这些数据的获得无疑会对从分子水平深入了解脂蛋白的结构、功能和代谢, 以及脂蛋白与疾病的内在联系提供有价值的资料.

参 考 文 献

- 1 Labeur C, Shepherd J, Rosseneu M. Immunological assay of apolipoproteins in plasma. methods and instrumentation. Clin Chem, 1990, **36**: 591~ 603
- 2 Yang Chaoyun, Gu Ziwei, Valentinova N *et al.* Human very low density lipoprotein structure. Interaction of the C apolipoprotein with apolipoprotein B-100. J Lipid Res, 1993, **34**: 1311~ 1321
- 3 Kandoussi A, Cachera C, Parsy D *et al.* Quantitative determination of different apolipoprotein B-containing lipoproteins by an enzyme linked immunosorbent assay: Apo B with apo C-III and apo B with apo E. J Immunoassay, 1991, **12**: 305~ 323
- 4 Alsayed N, Rebourcet R, Chapman J. Concentrations of apoprotein G-II, G-III and E in total serum and in the apoprotein B-containing lipoproteins determined by a new enzyme-linked immunosorbent assay. Clin Chem, 1990, **36**: 2047~ 2052
- 5 解用虹, 徐秀双, 郭 刚等. 人血浆载脂蛋白 E 的分离提纯. 生物化学与生物物理进展, 1992, **19**: 140~ 143

6 Albers J J, Cabana V G, Hazzard W R. Immunoassay of human plasma apolipoprotein B. *Metabolism*, 1975, **24**: 1339~ 1351

7 Steinbuch M, Audran R. The isolation of IgG from mammalian sera with the aid of caprylic acid. *Arch Biochem Biophys*, 1969, **134**: 279~ 284

8 Harlow Ed, Lane D. *Antibodies, A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. 288~ 299

9 Hurn B A L, Chantler S M. Production of reagent of antibodies. *Methods in enzymology*, 1980, **70**: 104~ 142

10 Harlow Ed, Lane D. *Antibodies, a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. 547~ 552

Quantitative Determination of Apo-E with Apo-B (LpB-E) in Human Plasma. XIE Yonghong (*Department of Biochemistry, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China*). GUO Gang (*Tianjin Prevention and Control Center of Metabolic Disease, Tianjin Medical Univer-*

sity, Tianjin 300070, China).
Abstract A non-competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for LpB-E was developed. Microtiter plates were used as solid-phase and coated with affinity purified goat antibodies to human apo-B. After incubating the antigen in standards and samples with coated plates, a horseradish peroxidase-labelled goat antibodies to human apo-E were added to the plates to estimate the apo-E with apo-B (LpB-E) by comparing with the standard carried out simultaneously. 120 samples of fasting human plasma randomly collected were quantitated for LpB-E and the results obtained were briefly discussed.
Key words lipoprotein, apolipoprotein, ELISA

阿达玛变换显微图象法测定 乳腺癌 DNA 含量*

唐宏武¹⁾ 陈观铨 梅二文 曾云鄂¹⁾
(武汉大学分析测试科学系, 武汉 430072)

摘要 以吖啶橙为细胞 DNA 荧光探针, 用阿达玛 (Hadamard) 变换显微图象分析仪和显微荧光光度计分别测定了 4 例乳腺癌的细胞 DNA 含量 (倍性), 并对分析结果进行了比较, 二者的分析结果均与病理学诊断结论相吻合. 阿达玛变换显微图象分析仪作为一种新的细胞定量分析仪器, 其分析结果的准确度可与显微荧光光度计相媲美, 而且阿达玛变换显微图象分析仪还具有其独特的优点, 如信噪比高、具有同时分析多个细胞和同步扣除背景信号的能力等.

关键词 阿达玛变换, 图象分析, 显微荧光光度计, 乳腺癌, DNA 含量

正常人各种组织内 DNA 含量是较恒定的二倍体, 不随性别、年龄、种族而改变. 恶性肿瘤细胞 DNA 含量和细胞群体的细胞增殖活性是判断肿瘤恶性程度、预后好坏的重要指标, DNA 含量倍体水平不断增高, 异倍体的出现是恶性肿瘤的一种重要生物学标志^[1]. 因此对肿瘤细胞 DNA 含量进行测定具有十分

重要的意义. 目前对细胞群体的细胞增殖活性的研究大多采用流式细胞术 (FCM), 但该分析术所用仪器价格昂贵, 难以推广. 显微光度 (荧光) 法是常用的另一种方法, 它既能提供

* 国家自然科学基金 (29375206) 和湖北省自然科学基金 (94J092) 资助课题.
¹⁾ 武汉大学化学系.
收稿日期: 1996-05-24, 修回日期: 1996-10-15