

## 技术与方法

# 一种分离人血浆脂蛋白 (a) 的简便方法\*

张文武 许春玲 洪嘉玲

(湖北医学院生物化学教研室, 武汉 430071)

### 提 要

短时间超速离心(4h)结合抗人 apo(a)免疫亲和层析分离纯化了人血浆 Lp (a), 所得制品经聚丙烯酰胺凝胶电泳和 double-decker 火箭免疫电泳等鉴定为纯品. 与国外常规分离 Lp (a) 的方法相比, 该法具有简便, 经济, 提纯周期短和 Lp (a) 纯度高优点, 得率提高一倍以上.

**关键词** 脂蛋白 (a), 免疫亲和层析, 分离纯化

脂蛋白 (a) [Lp (a)] 是一种特殊的脂蛋白, 与动脉粥样硬化关系密切, 高 Lp (a) 个体易于中青年时期早发冠心病<sup>[1,2]</sup>. Lp (a) 除含与低密度脂蛋白 (LDL) 相同的载脂蛋白 (apo) B100 外还含有特异的 apo (a), 二者以二硫键相连. 与一般的血浆脂蛋白不同, Lp (a) 的密度区间宽, 多数集中于 1.05—1.12 g/ml 密度区域, 与 LDL 及高密度脂蛋白 (HDL) 的密度重叠<sup>[3,4]</sup>, 因此分离难度较大. Lp (a) 的分离方法国外已有报道<sup>[3,4]</sup>, 最近国内也有按国外方法分离 Lp (a) 的报道<sup>[5]</sup>, 其分离 Lp (a) 的过程是先经二次 20h 以上的超速离心分离密度为 1.05—1.12g/ml 部分, 然后用凝胶层析分离其中的 Lp (a). 此法有两个缺点: 一是超速离心时间长, 费用高; 二是离心时密度范围窄, 加上凝胶层析的低回收率, Lp (a) 的得率很低, 一般只有 15%—20%<sup>[6]</sup>. 我们利用免疫亲和层析高特异性和高回收率的特点, 建立了一种短时间超速离心结合免疫亲和层析分离 Lp (a) 的方法, 成功地分离了几批 Lp (a), 纯度和得率都优于国外常规方法, 并已用于基础和临床研究.

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂

Lp (a) 标准品, 标准羊抗人 Lp (a), apoAI, apoB, apoC1, apoC III 和 apoE 等抗血清: Dr. McConathy 赠送 (美国俄克拉荷马州脂类研究实验室). 溴化氰: merck 产品. Sepharose 4B: Pharmacia 产品. 磷钨酸 (AR): 上海化学试剂厂产品. 聚乙二醇 (PEG) 20000: 日本进口分装. 其它试剂均为国产 AR.

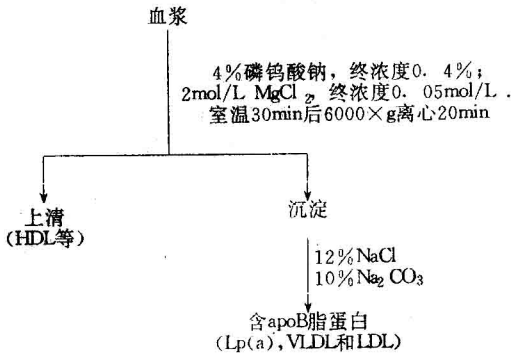
### 1.2 Lp (a) 的分离纯化

**1.2.1 免抗人 apo (a) IgG-Sepharose 4B 免疫亲和柱的制备** 参照国外方法<sup>[3,4]</sup>, 序列超速离心结合凝胶层析分离人血浆 Lp (a), 免疫家兔制备免抗人 Lp (a) 抗血清, 然后相继经 LDL ( $d=1.02-1.05$ ) 和 HDL ( $d=1.12-1.21$ ) -Sepharose 4B 免疫亲和柱 (自制) 纯化得到单价免抗人 apo (a) 抗血清.  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  分段盐析结合 DEAE-Sephadex A50 离子交换层析制备抗人 apo (a) IgG<sup>[7]</sup>, 对 pH8.1, 0.1mol/L NaHCO<sub>3</sub> 彻底透析后与用溴化氰活

\*国家自然科学基金资助项目.

化的 Sepharose 4B 交联<sup>[8]</sup>, 1mol/L 乙醇胺封闭残留的活性基团后 4℃ 保存备用。

**1.2.2 粗提 Lp (a)** 单向火箭免疫电泳法<sup>[4]</sup>从健康献血员中筛选高 Lp (a) 个体, 血液经 EDTA (1mg/ml) 抗凝后, 4℃ 低速离心分离血浆, 立即加入 EDTA, NaN<sub>3</sub> 和氯霉素使终浓度分别为 0.01%, 0.01% 和 50mg/L 后, 按 Brustein 法制备含 apoB 脂蛋白<sup>[9]</sup>。



在彻底透析的含 apoB 脂蛋白中加入固体 KBr 使  $d=1.21\text{g/ml}$ , 置于离心管内, 其上铺一层  $d=1.12\text{g/ml}$  的 KBr 溶液, 于 Beckman L8-80 型超速离心机, Ti80 角转头, 10℃ 343000×g 离心 4h. 离心毕收集上层  $d<1.12\text{g/ml}$  部分脂蛋白, 对平衡缓冲液 (0.025mol/L Tris-HCl, 含 0.15mol/L NaCl, 0.01% EDTA 和 0.01% NaN<sub>3</sub>, pH7.4) 透析 24h, 4℃ 备用。

**1.2.3 Lp (a) 的纯化** 兔抗人 apo (a) IgG-Sepharose 4B 装柱 (1.0cm×25cm), 用平衡缓冲液平衡后取超速离心  $d<1.12$  部分上样, 以 24ml/h 流速相继用平衡缓冲液及含 0.5mol/L NaCl 的平衡缓冲液洗脱未结合和非特异性结合蛋白, 最后用 pH10.5 的生理盐水洗脱特异性结合的 Lp (a). 收集 2.5ml/管, 合并结合峰中  $A_{280}>0.1$  各管, 立即对平衡缓冲液透析至中性, 30%PEG-20000 浓缩至蛋白含量 1mg/ml, 分装后 -20℃ 保存。

**1.3 Lp (a) 的纯度鉴定**

**1.3.1 脂蛋白聚丙烯酰胺凝胶电泳** 按本室方法制备 3.75% 分离胶, 2.5% 浓缩胶<sup>[10]</sup>. 用苏丹黑 B 染脂质, 考马斯亮蓝 R-250 染蛋白质。

**1.3.2 免疫双扩散** Lp (a) 制品分别对标准羊抗人 apoA I, Lp(a), apoB, apoC I, apoC III, apoD, apoE 和清蛋白抗血清进行双扩散。

**1.3.3 Double-decker 火箭免疫电泳** 参照 Gaubatz 方法进行<sup>[4]</sup>. 分别制备含有抗 Lp (a) 及抗 apoB 抗体的双层琼脂糖凝胶板, 在含抗 Lp (a) 抗体的凝胶上打孔, 上样后电泳 16h, 电压 10V/cm。

**2 结 果**

**2.1 Lp (a) 的亲 and 层析分离** 超速离心分离的  $d<1.12\text{g/ml}$  部分上抗人 apo (a) IgG-Sepharose 4B 亲和柱后, 经系列洗脱,  $A_{280}$  测得 3 个吸收峰 (图 1)。

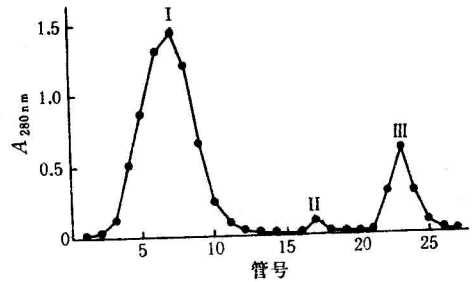


图 1 抗人 apo (a) IgG-sepharose 4B 亲和层析洗脱图谱

峰 I 和峰 II 分别为未结合和非特异性结合峰, 峰 III 为特异性结合峰

**2.2 Lp (a) 的鉴定** 峰 III 经免疫双扩散鉴定, 仅对标准羊抗人 Lp (a) 和 apoB 抗体反应, 而与其它载脂蛋白抗体不发生免疫沉淀反应 (图 2), 表明峰 III 只含有 apo (a) 和 apoB 二

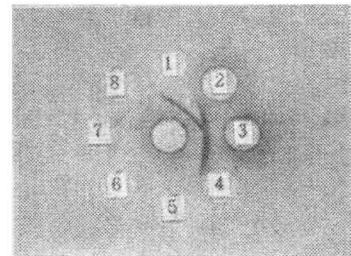


图 2 Lp (a) 制品的免疫双扩散  
中央孔: 纯化的人血浆 Lp (a) 周边孔 1—8 分别为标准羊抗人 apoA I, Lp (a), apoB, apoC I, apoC III, apoD, apoE 和清蛋白抗血清

种载脂蛋白。聚丙烯酰胺凝胶电泳时，峰Ⅲ呈前β迁移率(苏丹黑B预染)，用考马斯亮蓝R-250复染，仅见一条蛋白区带(图3)，表明峰Ⅲ无其它血浆蛋白的污染。

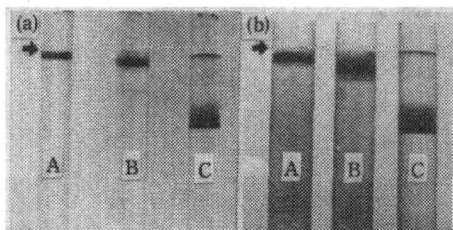


图3 脂蛋白聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱

(a) 苏丹黑B预染，(b) 考马斯亮蓝R-250复染。  
A 为本文纯化的Lp(a)，B和C为序列超速离心分离的LDL和HDL。箭头所示为分离胶起点

为进一步鉴定Lp(a)制品中是否存在LDL，我们对峰Ⅲ用double-decker火箭免疫电泳进行了分析，结果显示纯化的Lp(a)只在抗Lp(a)凝胶部分产生沉淀线，而Lp(a)和LDL的混合物在抗Lp(a)和抗apoB凝胶部分均有沉淀线产生，表明本文提纯的Lp(a)为纯品，无LDL的污染(图4)。

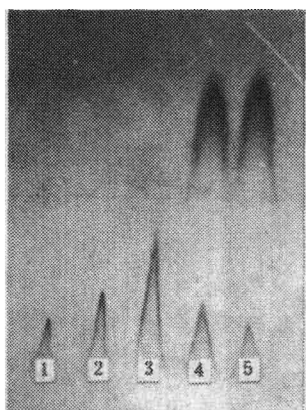


图4 Double-decker火箭免疫电泳结果

1—3孔为纯化的Lp(a)，4和5孔为Lp(a)+LDL

### 3 讨 论

国外研究表明，高Lp(a)个体易患冠心病，其危险程度为正常人的2—5倍<sup>[1,2]</sup>。最近McLean和Eaton等人分别用cDNA克隆技术和氨基酸序列分析发现Lp(a)特有的apo(a)中存在与纤溶酶原相似的序列<sup>[11,12]</sup>，为进

一步研究Lp(a)与动脉粥样硬化(As)的关系提供了新的线索，引起了国内外学者的关注。在探讨Lp(a)与As的关系时必须分离出纯度高的Lp(a)，为此我们建立了短时间超速离心结合免疫亲和层析纯化人血浆Lp(a)的方法。本法先用多聚阴离子沉淀含apoB脂蛋白，经4h超速离心后用抗人apo(a) IgG-Sepharose 4B亲和层析特异性地分离Lp(a)。此法仅用4h超速离心，使提纯周期缩短，费用大大降低，而且离心时密度范围宽，加上免疫亲和层析的高回收率，得率远较国外常规法为高，据不完全计算，本法分离几批Lp(a)的平均得率为37%。

Lp(a)的纯度鉴定也是一个棘手的问题，一般用来鉴定脂蛋白纯度的方法难以鉴定出Lp(a)中混杂的LDL。这是因为Lp(a)与LDL的分子大小接近，而且含有相同的apoB100。虽然有学者报道梯度聚丙烯酰胺凝胶电泳可将Lp(a)与LDL分开<sup>[13]</sup>，但到目前为止还是double-decker火箭免疫电泳最为理想，也是鉴定Lp(a)纯度最严格的方法<sup>[4]</sup>。在Lp(a)的分离过程中，我们发现国外常规法分离的Lp(a)只有层析第一峰的上升支纯度较高，其它均有LDL的污染，而本法分离的几批Lp(a)经double-decker火箭免疫电泳鉴定均未发现有LDL的污染。

总之，本文报道的Lp(a)分离方法具有简便，经济，提纯周期短，Lp(a)纯度和得率高等优点，为本室进一步开展Lp(a)与As关系的研究打下了良好的基础。

### 参 考 文 献

- 1 Brown M S, Goldstein J L. Plasma lipoproteins teaching old dogmas new tricks. *Nature*, 1987; **330**:113
- 2 Armstrong V W, Cremer P, Eberle E *et al.* The association between serum Lp(a) concentrations and angiographically assessed coronary atherosclerosis. Dependence on serum LDL levels. *Atherosclerosis*, 1986; **62**(3):249
- 3 Gaubtz J W, Chari M V, Nava M L *et al.* Human plasma lipoprotein(a): structure properties. *J Biol Chem*, 1983; **258**(7):4582

- 4 Gaubtz J W, Cushing G L, Morrisett J D. Quantitation, isolation and characterization of human lipoprotein (a). *Methods in Enzymol*, 1987; **129**:167
- 5 许平, 庄一义, 汪俊军等. 人血清脂蛋白(a)的分离纯化及其抗血清制备. *中华医学检验杂志*, 1991; **14**(4):194
- 6 Albers J J, Marcovina S M, Lodge M S. The unique lipoprotein(a): properties and immunochemical measurement. *Clin Chem*, 1990; **36**(12):2019
- 7 王世中编. 免疫化学技术. 北京: 科学出版社, 1980; 4—5
- 8 March S C, Parikh I, Cuatrecasas P. A simplified method for cyanogen bromide activation of agarose for affinity chromatography. *Anal Biochem*, 1974; **60**:149
- 9 Burstein M, Scholnick P, Morfin R. Rapid method for the isolation of lipoproteins from human serum by precipitation with polyanions. *J Lipid Res*, 1970; **11**:583
- 10 蒋中俊, 张华征, 殷以礼等. 血清脂蛋白四种电泳方法的比较. *湖北医学院学报*, 1980; **1**:18
- 11 McLean J W, Tomlinson J E, Kung W J *et al.* cDNA sequence of human apolipoprotein(a) is homologous to plasminogen. *Nature*, 1987; **330**:132
- 12 Eaton D L, Fless G M, Kohr W J *et al.* Partial amino acid sequence of apolipoprotein(a) shows that it is homologous to plasminogen. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987; **84**(10):3224
- 13 McNamara J R. Screening for lipoprotein(a) elevations in plasma and assessment of size heterogeneity using gradient gel electrophoresis. *J Lipid Res*, 1989; **30**(5):745

## 人淋巴细胞低密度脂蛋白受体酶联测定法的研究\*

洪 瑛 刘秉文\*\* 傅明德

(华西医科大学生物化学与分子生物学研究所, 成都 610041)

### 提 要

将辣根过氧化物酶与低密度脂蛋白交联, 并将人淋巴细胞固定于酶标板上, 成功地建立了淋巴细胞 LDL 受体酶联测定法. 此法特异、灵敏、可靠, 不需放射性同位素。

**关键词** 淋巴细胞, LDL 受体, 酶联测定法

低密度脂蛋白 (LDL) 受体是广泛存在于各组织细胞膜的跨膜糖蛋白<sup>[1]</sup>. LDL 受体活性与血浆胆固醇水平及冠心病的发生有明显关系<sup>[2]</sup>. 测定细胞 LDL 受体对动脉粥样硬化发病机理的研究及诊断家族性高胆固醇血症 (FH) 等具有重要意义. 我们利用辣根过氧化物酶 (HRP) 与纯化的 LDL 交联, 并将人淋巴细胞固定于酶标板上, 成功地建立了人淋巴细胞 LDL 受体酶联测定法. 经方法学研究证明本法特异、灵敏、可靠、简便、不需放射性同位素, HRP-LDL 酶联物较<sup>125</sup>I-LDL 稳定, 易于在一般实验室推广应用.

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

辣根过氧化物酶 (HRP, RZ=3.0) Sigma 公司产品, RM1640 培养液为日本制药株式会社产品, HEPES 为 Merck 公司产品, 淋巴细胞分离剂 (Ficoll) 购自上海试剂三厂, 戊二醛进口分装. 55 孔聚苯乙烯酶标板为四川分析仪器厂产品, 临用前用 95% 乙醇处理.

\* 卫生部科学基金资助课题.

\*\* 通讯联系人.

收稿日期: 1992-03-21 修回日期: 1992-07-13