

- teine acrylamide adduct in isoelectricfocusing gels. J Chromatogr, 1990, **500**: 697~ 704
- 4 Cossu G, Pirastru M G, Satta M *et al.* Carrier ampholyte mediated oxidation of proteins in isoelectricfocusing. J Chromatogr, 1989, **475**: 283~ 292
- 5 Chiari M, Righetti P G. New types of separation matrices for electrophoresis. Electrophoresis, 1995, **16** (10): 1815~ 1829
- 6 Righetti P G, Gelfi C, Bosisio A B. Polymerization kinetics of polyacrylamide gels. III. effect of catalysts. Electrophoresis, 1981, **2** (6): 291~ 295
- 7 Lyubimova T, Caglio S, Gelfi C *et al.* Photopolymerization of polyacrylamide gels with methylene blue. Electrophoresis, 1993, **14** (1): 40~ 50
- 8 姚启智, 侯立向, 周海梦等. 肌酸激酶肌变性时的构象变化. Sci Sin, 1982, **B** (10): 892~ 897
- 9 Heil A, Muller G, Noda L *et al.* The amino-acid sequence of porcine adenylate kinase from skeletal muscle. Eur J Biochem, 1974, **43** (1): 131~ 144
- 10 Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 1970, **227** (5259): 680~ 685
- 11 Reisfeld R A, Lewis U J, Williams D E. Disk electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamidegels. Nature, 1962, **195** (4838): 281~ 283
- 12 周启贤, 王希成, 张艳玲等. 脉梯度电泳方法的技术关键. 生物化学和生物物理进展, 1996, **23** (2): 172~ 175
- 13 Rabilloud T, Vincon M, Garin J. Micropreparative one- and two-dimensional electrophoresis: improvement with new photopolymerization systems. Electrophoresis, 1995, **16** (8): 1414~ 1422
- 14 Lyubimova T, Righetti P G. On the kinetics of photopolymerization: A Theoretical study. Electrophoresis, 1993, **14** (3): 191~ 201
- 15 Caglio S, Righetti P G. On the pH dependence of polymerization efficiency, as investigated by capillary zone electrophoresis. Electrophoresis, 1993, **14** (5): 554~ 558
- 16 Caglio S, Chiari M, Righetti P G. Gel polymerization in detergents: conversion efficiency of methylene blue vs. persulfatecatalysis, asinvestigated by capillary zone electrophore-

- sis. Electrophoresis, 1994, **15** (2): 209~ 214
- 17 Creighton T E, Shortle D. Electrophoretic characterization of the denatured states of Staphylococcal Nuclease. J Mol Biol, 1994, **242** (5): 670~ 682
- 18 Rabilloud T, Girardot V, Lawrence J J. One and two dimensional histone separations in acidic gels: usefulness of methylene blue-driven photopolymerization. Electrophoresis, 1996, **17** (1): 67~ 73
- 19 Rabilloud T. Solubilization of proteins for electrophoresis analyses. Electrophoresis, 1996, **17** (5): 813~ 829

A New Photopolymerization System for Polyacrylamide Gel. ZHOU Jun-xian, ZHOU Jun-mei (*National Laboratory of Biomacromolecules Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China*).

Abstract A method for photopolymerization of polyacrylamide gel with methylene blue (initiator), sodium toluenesulfinate (reducer) and diphenyl iodonium chloride (oxidizer) features simple operation, reliable gelation, good reproducibility and easy control of gelation, which is advocated as a valid alternative to the most popularly used AP/TEMED and Rf/TEMED ones. This method was tested for SDS and uDGGE with acidic buffer system, and satisfactory results were obtained. These preliminary experiments demonstrate that this novel method of photopolymerization gives reliable results and is another choice for gel polymerization.

Key words methylene blue, photopolymerization, polyacrylamide gel electrophoresis

人血清脂蛋白 (a) 中纤维蛋白溶酶原位点测定

汪俊军 庄一义

(南京军区南京总医院全军医学检验中心, 南京 210002)

摘要 用单克隆抗载脂蛋白(a)抗体为包被抗体,酶标抗纤维蛋白溶酶原(Pg)抗体为检测抗体建

收稿日期: 1997-05-28, 修回日期: 1997-07-21

立了人血清脂蛋白 (a) [Lp(a)] 中 Pg 位点的酶联免疫吸附试验法. 方法特异, 测定范围为 28~880 mg/L, 变异系数批内为 4%~6%, 批间为 7%~9%. 检测了正常人、冠心病 (CHD) 和肾衰血透患者 (CRF) 血清 Lp(a)、Lp(a) 中 Pg 位点和 Pg/Lp(a) 比值. 结果示正常人血清 Lp(a) 水平分别同 Pg、Pg/Lp(a) 呈正、负相关. CHD 和 CRF 患者 Lp(a)、Pg 位点和 Pg/Lp(a) 比值明显高于正常人, 认为 Lp(a) 中 Pg 位点测定对于动脉粥样硬化的病理生理研究具有特殊的价值.

关键词 脂蛋白 (a), 纤溶酶原, 酶联免疫吸附法, 动脉粥样硬化

学科分类号 Q392

脂蛋白 (a) [Lp(a)] 由载脂蛋白 (a) [apo(a)] 和 apoB 经二硫键连接而成, apo(a) 基因位于染色体 6q2.6~q2.7, 30 多个等位基因调节 apo(a) 的多态性, apo(a) 和纤维蛋白溶酶原 (Pg) 的结构具高度同源性, 分子中 Kringle IV 拷贝数目不同构成 apo(a) 多态性, apo(a) 多态性同血浆 Lp(a) 水平相关^[1~3]. 血浆高浓度 Lp(a) 是动脉粥样硬化 (As) 性心脑血管疾病的独立危险因素^[4,5]. Lp(a) 致 As 机制主要为 apo(a) 竞争结合细胞表面 Pg 受体干扰纤溶系统作用^[1]. 最近研究表明: 氧化 Lp(a) 增强了 Lp(a) 同 Pg 的同源性, 易于被巨噬细胞-清道夫受体识别和摄取^[6], 更具致 As 作用. 不同个体 Lp(a) 被氧化修饰程度、apo(a) 表型均可引起 Lp(a) 同 Pg 同源程度的差异, 以往关于 Lp(a) 临床研究均采用血清 Lp(a) 水平表示, 本文报道检测人血清 Lp(a) 中 Pg 位点的酶联免疫吸附法 (ELISA), 并进行了初步临床观察.

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 Lp(a) 提取及单克隆抗体制备^[7]: 取富含 Lp(a) 的新鲜人血清, 用 Beckman L8-80M 型超速离心机提取密度为 1.055~1.110 kg/L 的脂蛋白成分, 再经 Sepharose 6B 柱层析, 获得纯 Lp(a). 常法免疫制备单克隆抗体, 经鉴定得到二株同 Pg 无交叉反应针对不同 apo(a) 位点的杂交瘤细胞株, 扩大培养制备腹水, 提取 IgG.

1.1.2 Pg 及抗血清: 上海生物制品研究所产品.

1.1.3 包被抗体: 以 33% 饱和硫酸铵沉淀法制备, 二株等量混合.

1.1.4 酶标抗体: 改良过碘酸钠法标记.

1.1.5 参考血清: 富含 Lp(a) 的冻干血清, Lp(a) 经 Immuno Vienna AG 定值血清标定为 440 mg/L; Lp(a) 中 Pg 位点也以此浓度计.

1.2 方法

1.2.1 Lp(a) 中 Pg 位点的 ELISA 检测法: 将混合的单抗 apo(a) 用包被液稀释成 4 mg/L, 加入聚苯乙烯反应板中, 0.1 ml/孔, 37℃ 2 h 后, 放置 4℃ 过夜, 洗涤; 加入 1:600 稀释的被检样品、倍比稀释的参考血清或空白管, 0.1 ml/孔, 37℃ 1 h, 洗涤; 加入 1:400 HRP-抗 Pg, 37℃ 1 h, 洗涤; 底物显色, H₂SO₄ 终止反应, 于 525 nm 处读数.

1.2.2 Lp(a) 的 ELISA 测定法^[7]: 酶标抗体为 1:4 000 HRP-抗 apo(a), 步骤同上.

1.3 实验对象

冠心病患者 (CHD, 经冠状动脉造影证实或心肌梗塞存活者) 46 例; 慢性肾衰患者 (CRF, 系本院肾病研究所确诊的接受透析治疗) 60 例; 正常对照组为无肾脏和心脑血管疾病的体健者. 血液标本采自禁食 12 h 以上.

2 结果与讨论

2.1 实验条件

包被聚苯乙烯微孔板的抗 apo(a) 浓度及酶标抗 Pg 的稀释度均由棋盘试验确定. 当抗 apo(a) 为 4 mg/L, HRP-抗 Pg 稀释度为 1:400 时, 得到的标准曲线较为理想 (图 1). 样本稀释 600 倍, 过高、过低浓度改变稀释倍数再行测定.

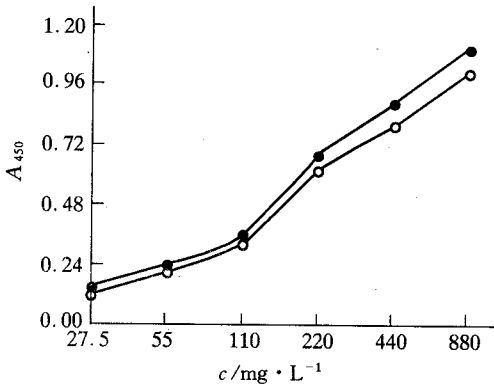


图1 标准曲线

●—●: Lp(a); ○—○: Lp(a)-Pg.

2.2 方法评价

2.2.1 精密度: 本法可检出Lp(a)中Pg位点4.6~147 ng/孔, 样本稀释600倍, 对应于人血清中28~880 mg/L.

2.2.2 特异性检验: 检测孔中加入高浓度的apoB, Pg以及apoA I、A II, C, E, 白蛋白等未见有阳性反应.

2.2.3 重复性: 分别测定Lp(a)含量不等的样本, 批内、批间的平均变异系数分别介于4%~6%、7%~9%.

本文建立了Lp(a)中Pg位点的ELISA检测法, 采用单抗apo(a)为包被抗体, 酶标抗Pg检测Lp(a)颗粒中的Pg位点, 因抗apo(a)同Pg无交叉反应性, Pg无干扰作用. 以低分子apo(a)表型的高浓度Lp(a)中Pg为参考血清, 同Lp(a)测定一样, 样本和参考间apo(a)表型不一致可影响测定结果.

2.3 人群分析

测定了108例正常人群、46例冠心病、60例慢性肾衰患者血清Lp(a)、Lp(a)中Pg位点浓度及Pg/Lp(a)比值见表1.

表1 CHD、CRF及对照人群Lp(a)、Lp(a)中Pg位点浓度和 $c(\text{Pg})/c[\text{Lp(a)}]$ 比值

组别	<i>n</i>	$c[\text{Lp(a)}(\text{中位数})]/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	$c(\text{Pg位点})/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	$c(\text{Pg})/[Lp(a)]$
CHD	46	$234.0 \pm 162.8 (201)^{1)}$	$227.7 \pm 205.5^{2)}$	$0.93 \pm 0.40^{1)}$
CRF	60	$244.6 \pm 174.3 (225)^{2)}$	$192.7 \pm 146.3^{2)}$	$0.83 \pm 0.29^{2)}$
Control	108	$185.7 \pm 171.8 (102)$	106.6 ± 97.0	0.68 ± 0.31

注: ¹⁾ $P < 0.01$, ²⁾ $P < 0.001$, Lp(a)、Pg位点水平经对数校正后进行均数间 t 检验. $\bar{x} \pm s$.

正常人群中Lp(a)同Lp(a)中Pg位点、Pg/Lp(a)比值关系见图2和图3. Lp(a)水平同Pg位点呈高度正相关; 同Pg/Lp(a)比值呈高度负相关.

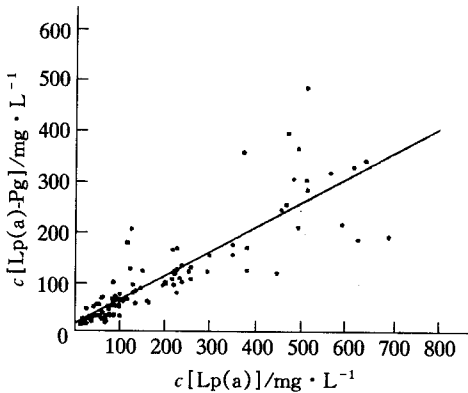


图2 Lp(a)同Lp(a)-Pg位点相关性

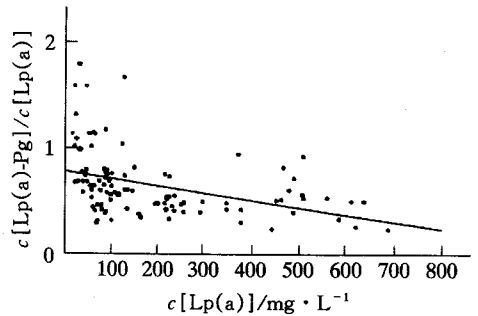


图3 Lp(a)同Lp(a)-Pg/Lp(a)相关性

对apo(a)多态性研究示^[2,8] apo(a)具有F、B、S₁、S₂、S₃、S₄等表型, 个体内可含有一种或两种表型, 小分子apo(a)表型(LMW) F、B伴高Lp(a)水平, S₁、S₂伴中等Lp(a), 大分子apo(a)表型(HMW) S₃、S₄伴低Lp(a)

水平. 不同 Kringle IV 重复序列构成 apo(a) 多态性, LMW 的 Kringle IV 重复序列少, Pg/Lp(a) 比值低; HMW 则比值高.

CHD、CRF 患者较对照人群 Lp(a)、Pg 位点、Pg/Lp(a) 均显著升高, Lp(a) 水平分别升高 26%、32%; 而 Pg 位点分别升高 114%、81%.

Naruszewicz 等^[6]报道 Lp(a) 经氧化后, 增强了同单抗 K07、K09 [针对 apo(a)、Pg 共同位点] 免疫反应性, 较天然 Lp(a) 能更高效地与 Pg 竞争结合细胞表面 Pg 受体; 且随着氧化程度增加而增加. 从不同个体提取的 Lp(a) 同 Pg 反应性亦不一致, 不是由 apo(a) 多态性引起, 认为与氧化修饰有关^[9]. 冠心病患者体内脂蛋白易发生氧化修饰^[10], 氧化脂蛋白在 As 发生和发展中起十分重要作用, 人体动脉壁处 Lp(a) 已被证实发生了氧化修饰^[11]. 肾衰患者机体处于易被氧化状态^[12]. 心脑血管疾病的高 Lp(a) 是由于 LMW 出现频率高引起^[8], 应使 Pg/Lp(a) 比值下降. 而肾病患者 apo(a) 表型分布同正常人相同^[13], 其高 Lp(a) 是因蛋白丢失, 刺激肝脏合成增加所致^[14], apo(a) 表型并不影响 Pg/Lp(a) 比值. 本文结果 Pg 位点、Pg/Lp(a) 比值升高提示 CHD、CRF 患者体内 Lp(a) 发生了明显的氧化修饰, 可能与 CHD、肾病患者心脑血管动脉硬化高发率^[14]有密切联系. Pg 位点较 Lp(a) 水平升高要明显, 我们认为 Lp(a) 中 Pg 位点测定较 Lp(a) 能更准确反映 Lp(a) 对纤溶系统的干扰作用, 对于动脉粥样硬化的病理生理研究具有特殊意义.

参 考 文 献

- 1 Scanu A M, Fless G M. Lipoprotein (a): heterogeneity and biological relevance. *J Clin Invest*, 1990, **85** (4): 1709~1715
- 2 Mclean J W, Tomlinson J E, Kuang W J *et al.* cDNA Sequence of human apo(a) is homologous to plasminogen. *Nature*, 1987, **300**: 132~137
- 3 Utermann G, Menzel H J, Kraft H G *et al.* Lp(a) glycoprotein phenotypes: inheritance and relation to Lp(a)-Lipo protein concentrations in plasma. *J Clin Invest*, 1987, **80** (1): 458~465
- 4 Rhoads G G, MPH M D, Dahlen G *et al.* Lp(a) lipoprotein as a risk factor for myocardial infarction. *JAMA*, 1986, **256** (18): 2540~2544
- 5 庄一义, 汪俊军, 许平等. 心脑血管病患者脂蛋白(a)测定及临床意义. *中华医学杂志*, 1992, **72** (3): 162~164
- 6 Naruszewicz M, Giroux L M, Davignon J. Oxidative modification of Lp(a) causes changes in the structure and biological properties of apo(a). *Chemistry and Physics of Lipids*, 1994, **67/68** (1~3): 167~174
- 7 汪俊军, 庄一义, 张春妮等. 单克隆多克隆抗体酶联免疫吸附法测定血清脂蛋白(a)的比较. *中国动脉硬化杂志*, 1995, **3** (3): 244~246
- 8 Zhuang Y Y, Li J J, Wang J J. Apolipoprotein (a) phenotypes in cardiovascular diseases. *Chemistry and Physics of Lipids*, 1994, **67/68** (1~3): 293~297
- 9 Leerink C B, Duif P, Gimpel J A *et al.* Lysine-binding heterogeneity of Lp(a): consequences for fibrin binding and inhibition of plasminogen activation. *Thromb Haemostas*, 1992, **68** (1): 185~188
- 10 Holvoet P, Perez G, Zhao Z *et al.* Malondialdehyde-modified low density lipoproteins in patients with atherosclerotic disease. *J Clin Invest*, 1995, **95** (6): 2611~2619
- 11 Pepin J M, o'Neil J A, Hoff H F. Quantification of apo(a) and apoB in human atherosclerosis lesions. *J Lipid Res*, 1991, **32** (2): 317
- 12 石红联, 陈雨亭, 侯京武等. 慢性肾衰病人血清和红细胞抗氧化能力的 ESR 研究. *生物物理学报*, 1993, **9** (3): 483~487
- 13 Kronenberg F, Koing P, Neyer U *et al.* Multicenter study of lipoprotein (a) and apolipoprotein (a) phenotypes in patients with end-stage renal disease treated by hemodialysis or continuous ambulatory peritoneal dialysis. *J Am Soc Nephrol*, 1995, **6** (1): 110~120
- 14 Kronenberg F, Utermann G, Dieplinger H. Lipoprotein (a) in renal disease. *Am J Kidney Dis*, 1996, **27** (1): 1~25

ELISA for the Plasminogen Epitopes of Serum Lipoprotein (a). WANG Jun-jun, ZHUANG Y-yi (Center of Clinical Laboratory Science of PLA, General Hospital of Nanjing Command, Nanjing 210002, China).

Abstract The epitopes of plasminogen (Pg) of serum lipoprotein (a) [Lp(a)] [Lp(a)-Pg] were determined by ELISA using monoclonal anti-apo(a) as the capture antibody and quantitating with anti-Pg enzyme conjugate. The assay range by this method was from 28 to 880 mg/L. The mean intra- and inter-assay coefficients of variation were 4%~6% and 7%~9%, respectively. The serum Lp(a) concentration was posi-

tively correlated with serum Lp(a)-Pg level and negatively with Lp(a)-Pg level to total Lp(a) [Lp(a)-Pg/Lp(a)] ratio. Serum Lp(a) concentration, Lp(a)-Pg level and Lp(a)-Pg/Lp(a) ratio were found significantly elevated in CHD and CRF patients compared with those in the controls. Determination of Lp(a)-Pg level and Lp(a)-Pg/Lp(a) ratio in patients with high incidence of atherosclerosis have special value.

Key words lipoprotein (a), plasminogen, ELISA, atherosclerosis

中国科技期刊排行表*
(按被引频次和影响因子排序)

生物学类:

名次	期刊名称	被引频次	名次	期刊名称	影响因子
1	植物学报	943	1	植物生态学报	0.4556
2	植物生理学通讯	553	2	植物学报	0.4286
3	植物生理学报	489	3	遗传学报	0.3926
4	遗传学报	419	4	植物生理学报	0.3860
5	生物化学与生物物理进展	383	5	古脊椎动物学报	0.3265
6	植物分类学报	366	6	细胞生物学杂志	0.2857
7	生物化学与生物物理学报	323	7	微生物学报	0.2549
8	云南植物研究	308	8	植物分类学报	0.2500
9	古生物学报	266	9	人类学学报	0.2444
10	动物学报	264	10	实验生物学报	0.2397

- 说明:
1. 中国科学引文数据库在连续两年公布《被引频次最高的中国科技期刊 100 名排行表》的基础上, 为使统计数据的排列从多种角度反映科技期刊状况, 特从 1996 年开始按学科编制《中国科技期刊排行表 (按被引频次和影响因子排序)》。
2. 被引频次是在对被中国科学引文数据库 1996 年 582 种来源期刊所引用的数千种中国出版的中英文期刊进行频次统计后编制而成。
3. 影响因子的计算方法如下:
- 1996 年某刊的影响因子=
$$\frac{\text{1996 年引用 1994 年和 1995 年该刊刊载论文的总次数}}{\text{1994 年和 1995 年该刊刊载论文的总次数}}$$
- 本表中 1996 年的影响因子是在对中国科学引文数据库 1994~ 1995 年的来源期刊作了统计后编制而成。由于计算影响因子受到期刊发文量数据的限制, 因此, 本表中只对能在中国科学引文数据库获得发文量数据的 315 种期刊作了统计。1996 年新增加的 267 种来源期刊因无发文量数据而未作统计。
4. 本着尊重原始数据的原则, 本表对变名期刊未作任何合并处理。

* 数据来源: 中国科学院文献情报中心中国科学引文数据库 1996 年数据。本表由中国科学引文数据库统计编制。