

二步超离心法分离纯化人血浆 Apo B100 及兔抗人 Apo B100 抗血清制备

张海花^{1b}, 王 婕^{1a}, 高 慧², 付彩云^{1a}, 童富淡^{1b}

(1. 浙江理工大学, a. 生命科学学院, b. 浙江省家蚕生物反应器和生物医药重点实验室, 杭州 310018;

2. 浙江省畜牧技术服务中心, 杭州 310021)

摘 要: 建立一种从人血浆中分离纯化 Apo B100 的方法, 并制备兔抗人 Apo B100 抗血清。将血浆用溴化钾调成 1.019 g/mL 的密度液进行差超速离心, 将分离产物在溴化钾不连续密度梯度液(1.006~1.210 g/mL)中进行等密度超速离心。用 G-100 葡聚糖凝胶柱纯化 Apo B100, 以 ELISA 双抗体夹心法检测浓度, 真空冷冻干燥。取冻干粉与弗氏佐剂混合后免疫新西兰白兔, 制备兔抗人 Apo B100 抗血清, 利用双向免疫扩散检测抗原纯度与抗血清效价。结果是一步超离法分离的 Apo B100 最高浓度为 0.91 $\mu\text{g/mL}$; 二步超离法分离的 Apo B100 最高浓度为 1.40 $\mu\text{g/mL}$, 对应的抗血清效价为 1:64。结果表明二步超离心法提高了人血浆 Apo B100 的分离效果。

关键词: Apo B100; 超速离心; ELISA; 双向免疫扩散

中图分类号: Q33 **文献标识码:** A

0 引 言

血浆中脂质与蛋白质相结合成血浆脂蛋白(lipoprotein, LP)。胆固醇、三酰基甘油及其它脂类在血液中由相应的脂蛋白参与其运输, 脂蛋白按密度从小到大分为 4 类, 即乳糜微粒(chylomicrons, CM)、极低密度脂蛋白(very low density lipoproteins, VLDL)、低密度脂蛋白(low density lipoproteins, LDL)和高密度脂蛋白(high density lipoproteins, HDL)^[1-2]。

LDL 是血浆中胆固醇含量最高的一种脂蛋白, Apo B100 占 LDL 中载脂蛋白 95% 以上, Apo B100 分子量为 513 kD, 是迄今为止发现的分子量最大的哺乳类蛋白分子, 也是 LDL 的结构蛋白, 参与脂质的转运。Apo B100 分子内亲水肽段与疏水肽段交替存在, 前者浮于 LDL 颗粒表面, 后者埋入脂质核心, 每一分子 LDL 颗粒只含有一分子 Apo B100。由于 Apo B100 分子量大, 且具有疏水性, 一般进行

带脂分离。

脂蛋白的分离方法有沉淀法、电泳法、免疫分离法及超速离心法等。超速离心法是分离脂蛋白的最常见分类方法, 属于物理分离法, 影响因素最少, 故常被使用^[3]。

脂蛋白的水合密度较其他血浆蛋白低, 可通过漂浮超速离心将其从血浆中分离出来^[4]。这种方法可用于制备大量脂蛋白样本或少量临床研究的样本, 加入 NaCl 和/或 KBr 后, 血浆密度增加, 在超速离心过程中各类脂蛋白因其密度不同而上浮速率各异, 每类脂蛋白可通过依次增加血浆密度而分离。此外, 在脂蛋白家族中, 还有一类脂蛋白 Lp(a)(lipoprotein(a)), 为 LDL 与载脂蛋白(a)的二硫键结合分子, 密度为 1.050~1.110 g/mL, 与 LDL 的密度范围重合。可用还原剂 β -巯基乙醇还原 Lp(a), 排除其对超离法分离 LDL 的干扰^[5]。

本文探索了用二步超速离心法分离人血浆 Apo B100 的方法, 用 ELISA 与双向免疫电泳检测 Apo

B100 的分离效率,以提高 Apo B100 的纯度和得率。

1 材料与方法

1.1 实验材料与试剂

新鲜血浆购自杭州市血液中心,新西兰纯种雄性白兔由杭州师范大学实验动物中心提供。人 Apo B 100 ELISA 试剂盒为 Uscn Life Science & Technology Company 产品,G-100 葡聚糖凝胶为 Pharmacia 产品,弗氏完全佐剂为北京希凯创新科技有限公司产品。溴化钾,乙二胺四乙酸二钠, β -巯基乙醇,Tris-HCl,磷酸氢二钾,石蜡油,羊毛脂,琼脂糖等均系国产分析纯试剂。

1.2 主要仪器

Optima™ L-80 XP 超速离心机(Beckman, USA;转头:S-70 AT 70 000 r/min, 505000Xg;转子:8X40 mL,K=44,40PA 管)、ER-182 A 电子分析天平(日本 Tykyo 公司)、Multiskan Spectrum 酶标仪(美国 Thermo 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 血浆样品的处理

实验用血浆 100 mL,4℃,3 000 g 离心 10 min 后取上清,加入 EDTA 溶液(终浓度为 0.04%)和 β -巯基乙醇(终浓度为 50 mmol/L),4℃保存备用。

1.3.2 二步超速离心

取样本血浆 80 mL,加入 KBr 1.4808 g,调节密度至 1.019 g/mL,KBr 的用量(g)按下式计算:

$$X = V(d_2 - d_1) / (1 - \nu d_2) \quad (1)$$

其中: V 为血浆量(mL); d_1 、 d_2 分别为该溶液始末密度,血浆 $d=1.006$ g/mL; ν 为 KBr 对于一定密度溶液的偏比容,溶液密度为 $d=1.019$ 、 1.210 的偏比容(ν)值分别为 0.2922、0.3090。

取已调好密度的血浆装满 2 个 40 mL 的超速离心管,70 000 r/min,16℃,加速系数设为 5、减速设为 7 超速离心 8 h,取出含 LDL 的液体层,即为 LDL 初提液。

按上述公式计算 KBr 的量,调节 LDL 初提液密度至 1.21 g/mL,同时配制 3 种不同密度的 KBr 水溶液,密度分别为 1.063 g/mL,1.019 g/mL,1.006 g/mL。取 3.0 mL LDL 初提液密度液(1.21 g/mL)加至体积为 10 mL 的超速离心管底部。取 2.5 mL 1.063 g/mL KBr 密度液沿离心管壁缓慢叠加在血浆之上,不使两液面相混;再取 2.5 mL 1.019 g/mL KBr 密度液同法加入超速离心管;最

后以 1.006 g/mL KBr 密度液加满超速离心管,上盖,放入转子。40 000 r/min,16℃,加速系数设为 7、减速为 5 超速离心 5 h,取出浅黄色的 LDL 液体层。

1.3.3 Sephadex G-100 凝胶层析^[6]

将容积为 75 mL 的凝胶层析柱固定在铁架台上,加入煮沸溶胀 5 h 的 Sephadex G-100 凝胶,用 0.1 mol/L(含 0.14 mol/L NaCl),pH 8.0 的 PBS 洗脱缓冲液平衡凝胶柱 1 d 至流出液的 A_{280} 值稳定,将 LDL 初提液用滴管缓慢加入,用上述洗脱缓冲液洗脱并收集;同时,以紫外检测仪检测各收集管流出液的 A_{280} 值。同法处理第二次超速离心得到的 LDL 液体层。

1.3.4 ELISA 检测 Apo B100 浓度

取各管收集的蛋白溶液 200 μ L,用上述洗脱缓冲液稀释 5 倍,混匀,每孔加样 100 μ L,用人血浆 Apo B100 ELISA 试剂盒,以双抗体夹心法检测 Apo B100 浓度。

1.3.5 冻干粉的制备

将凝胶层析后的收集液于 1 mmol/L EDTA (pH8.0) 溶液中 4℃透析 12 h,将透析后的溶液分装于 5 mL 灭菌小玻璃瓶中,置于-70℃冰箱预冻 2 h后,于真空冷冻干燥机上冷冻干燥 2 d,得 Apo B100 蛋白冻干粉。

1.3.6 兔抗人 Apo B100 抗血清的制备

以本法得到的人血浆 Apo B100 为抗原,通过 4 次(每次间隔 1 周)免疫新西兰兔,得到兔抗人 Apo B100 抗血清。第一次免疫以含 1 mg 抗原与 3 倍体积弗氏完全佐剂振荡混匀的样品,对兔子背部进行皮下多点注射,以后的 3 次加强免疫以弗氏不完全佐剂代替完全佐剂,抗原量逐次增加至 2、2.5 mg 和 3 mg,第 4 次免疫 1 周后颈动脉一次性放血,分离抗血清^[7]。

1.3.7 免疫双扩散法鉴定抗原纯度与抗血清效价

取熔化的 1%琼脂糖约 5 mL 倒在干净载玻片上,约 3 mm 厚,冷却凝固后,用打孔器打孔。中央孔内加 10 μ L 未稀释抗血清,周围各孔内分别加入 10 μ L 1:4、1:8、1:16、1:32 稀释后的抗原和生理盐水,37℃下湿盒孵育 24 h,观察沉淀线,以判断抗原纯度及抗血清效价。

2 结果与分析

2.1 二步超速离心结果

第一次超速离心结束后离心管内液体分为 4

层: 顶部乳白色层为乳糜微粒和极低密度脂蛋白, 从上而下第 2 层为透明水层, 第 3 层为浅黄色的低密度脂蛋白, 底层为深黄色的高密度脂蛋白。低密度脂蛋白与高密度脂蛋白的液体层紧连在一起, 边界不清晰。

第二次超速离心结束后离心管内液体分为 5 层: 从上而下第 1 层为透明水层, 第 2 层为浅黄色的低密度脂蛋白, 第 3 层为白色液体薄层, 第 4 层为深黄色的高密度脂蛋白, 离心管底部有少量白色沉淀。二步超离后低密度脂蛋白与高密度脂蛋白分离效果好。

2.2 Sephadex G-100 凝胶层析纯化结果

将第一次超离得到的低密度脂蛋白溶液和第二次超离得到的低密度脂蛋白溶液分别用 Sephadex G-100 柱层析纯化, 以核酸蛋白检测仪检测流出液的 A_{280} 值, 描记洗脱曲线(图 1)。

2.3 ELISA 检测结果

绘制标准曲线(图 2), 5 倍稀释后的上述溶液经 ELISA 测得的吸光度及计算出的浓度如表 1 所示。二次超离法的分离样品中人血浆 Apo B100 的含量增加, 提高了分离效果。

2.4 双向免疫扩散结果

当中心孔加入未稀释的抗原, 即浓度 $1.40\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 。周围孔加入倍比稀释的抗血清, 无沉淀线出现; 当中心孔加入稀释 7 倍的抗原, 与周围 1 : 2 和 1 : 4 的抗血清稀释孔之间出现沉淀线。

当中心孔加入未稀释的抗血清, 与 1 : 4、1 : 8、

1 : 16、1 : 32、1 : 64 的抗原稀释孔之间均有清晰的沉淀线产生(图 3)。

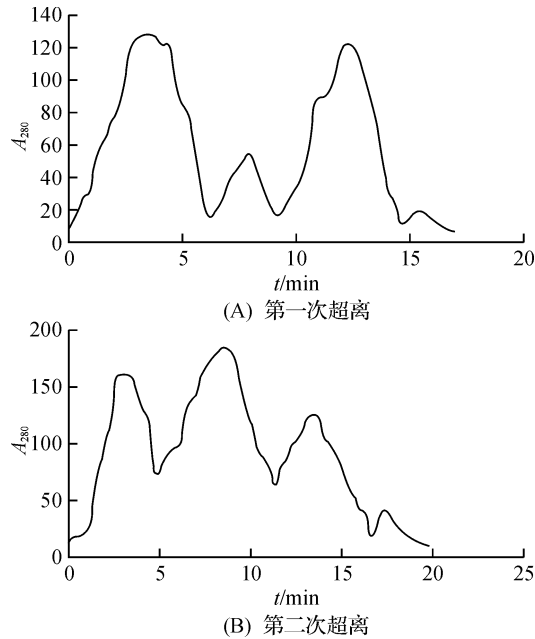


图 1 超离得到的低密度脂蛋白溶液洗脱曲线

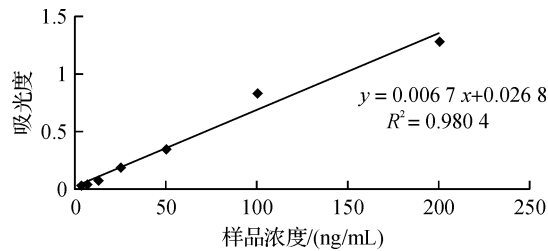
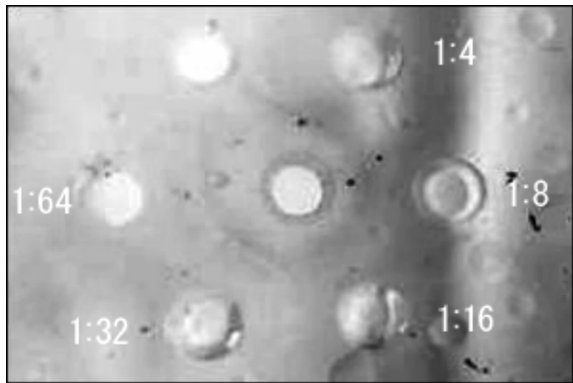


图 2 ELISA 标准曲线

表 1 葡聚糖 G-100 凝胶层析纯化后各管溶液的 ELISA 检测结果

洗脱液编号	第一次超离得到的低密度脂蛋白溶液				第二次超离得到的低密度脂蛋白溶液			
	1	2	3	4	1'	2'	3'	4'
A_{450}	1.05	0.49	0.79	0.59	1.58	1.90	1.90	0.47
Apo B100 浓度/ $(\mu\text{g}/\text{mL})$	0.91	0.35	0.57	0.42	1.16	1.40	1.39	0.33



中央孔为未稀释的抗血清, 自右上出现沉淀线的孔顺时针依次为 1 : 4、1 : 8、1 : 16、1 : 32、1 : 64 的倍比稀释抗原, 左上无沉淀线的孔为蒸馏水。

图 3 双向免疫扩散结果

3 结果与讨论

通过改进已有的 ApoB100 超速离心分离法, 本研究探索出了一种二步超速离心分离 Apo B100 的方法和技术。第一次差分超速离心后低密度脂蛋白液体层与高密度脂蛋白液体层的边缘重叠, 在此基础上进行第二次等密度区带超速离心, 低密度脂蛋白液体层与高密度脂蛋白液体层分离效果好, 证明第一次超速离心取得的低密度脂蛋白液体层存在一定数量的高密度脂蛋白; Sephadex G-100 柱层析后的 ELISA 检测表明二步超离法得到的 Apo B100 最高浓度是一步超离法最高浓度的 1.54 倍, 二步超离法进一步提高了 Apo B100 的浓度和纯度。

琼脂凝胶免疫扩散法测定血浆 ApoB100 所需抗原、抗血清量少,设备简单,操作简易。适合于抗体纯度与抗血清效价的定量定性研究。在本实验中,中心孔抗原不稀释,周围加入倍比稀释的抗血清经多次实验后并没有出现沉淀线,当中心孔抗原稀释至 1:7(0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$)时,与 1:2 和 1:4 稀释抗血清的孔之间出现沉淀线;而将未稀释的抗血清加入中央孔,周围加倍比稀释的抗原,抗原稀释至 1:64 时还有清晰的沉淀线产生。可能是抗原含量远大于抗体含量,导致在稀释抗血清的琼脂扩散实验中沉淀线产生不明显,具体原因有待进一步分析研究。

参考文献:

- [1] 辛艳飞,段云,邓祖跃,等. 中压液相层析法纯化人 VLDL 主要载脂蛋白[J]. 四川大学学报:医学版, 2007, 32(2): 328-330.
- [2] Tsimihodimos V, Gazi I, Kostara C, et al. Plasma lipo-

- proteins and triacylglycerol are predictors of small, dense LDL particles[J]. *Lipids*, 2007, 42(5): 403-409.
- [3] 董军,国汉邦,王抒,等. 超速离心-高效液相色谱测定血浆高密度和低密度脂蛋白胆固醇[J]. 中华检验医学杂志, 2006, 29(8): 742-746.
- [4] 周立尧,陈爱华,宋旭东. 血浆高密度脂蛋白的超速离心、氧化修饰及 DiI 标志[J]. 实用医学杂志, 2007, 23(7): 937-940.
- [5] Albers J J, Marcobina S M, Lodge M S. The unique lipoprotein(a): properties and immunechemical measurements[J]. *Clin Chem*, 1990, 36: 2019-2026.
- [6] 董军,国汉邦,李红霞,等. 超速离心 HPLC 测定血浆脂蛋白亚类和脂蛋白(a)胆固醇方法的建立[J]. 中华检验医学杂志, 2007, 30(2): 191-195.
- [7] 周新,柯三才,陈丽达,等. 兔载脂蛋白 B 抗血浆的制备及其测定方法的研究[J]. 湖北医科大学学报, 1993, 14(4): 300-304.

Preparation of Apo B100 Rabbit Anti-Human Antiserum

ZHANG Hai-hua^{1b}, WANG Jie^{1a}, GAO Hui², FU Cai-yun^{1a}, TONG Fu-dan^{1b}

- (1. Zhejiang Sci-Tech University, a. School of Life Sciences, b. Zhejiang Provincial Key Laboratory of Silkworm Bioreactor and Biomedicine, Hangzhou 310018, China; 2. Zhejiang Provincial Animal Husbandry Technology Service Center, Hangzhou 310021, China)

Abstract: To investigate a separation and purification method of Apo B100 from human serum and prepare rabbit anti-human Apo B100 antiserum. Plasma is fractionated in the presence of KBr at a density of 1.019 g/mL by differential ultracentrifugation. Liquid discontinuous density gradient (1.006 g/mL ~ 1.210 g/mL) is prepared with separated product by KBr density medium to further ultracentrifugation. The target protein is purified with Sephadex G-100 column, then double-antibody sandwich ELISA is used to determine the titer. The obtained product is vacuum freeze-dried after dialysis. The freeze-dried powder mixed with Freund's adjuvant is immunized to New Zealand White Rabbit to obtain rabbit anti-human Apo B100 antiserum. Purity and valence of the antiserum are detected by double immunodiffusion. The results indicate that the concentration of Apo B100 from one step ultracentrifugation is 0.91 $\mu\text{g}/\text{mL}$, and the concentration of Apo B100 from two step ultracentrifugation is 1.40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and the titer of the antiserum is 1:64. The two step ultracentrifugation improves the separation effect of Apo B100 in human Plasma.

Key words: ApoB100; ultracentrifugation; rabbit anti-human ApoB100 antiserum; double immunodiffusion

(责任编辑:许惠儿)