

• 技术交流 •

人血清载脂蛋白 C I 和 C II 的分离
提纯及其单克隆抗体的制备*黎健 蒋雷 赵满仓^① 陈文祥 李健斋

(卫生部北京老年医学研究所, 北京 100730)

Isolation and Purification of Human
Serum Apolipoprotein C I, C II and
Preparation of Their Monoclonal Anti-
bodiesLI Jian, JIAN Lei, ZHAO Man-Cang, CHEN Wen-
Xiang and LI Jian-Zhai

(Beijing Institute of Geriatrics, Beijing 100730, China)

ABSTRACT Apolipoprotein C I, C II were isolated and purified by ultracentrifugation, gel filtration and high performance liquid chromatography from human serum very low density lipoprotein. The purity of apo C I and C II was characterized by IEF, SDS-PAGE and double immunodiffusion. The BALB/C mice were immunized by purified apo C I or C II. 4 lines of hybridoma to apo C I and 2 lines of to apo C II which were able to secrete monoclonal antibodies (McAb) to human apo C I and apo C II respectively were established. The McAbs have no cross reaction to apo A I, A II, B, C I, E and human albumin.

KEY WORDS Apolipoprotein C I ;
Apolipoprotein C II ; Monoclonal antibody

摘要 本文应用超速离心、凝胶过滤层析、高效液相色谱法分离纯化人血清极低密度脂蛋白—载脂蛋白 C I 和 C II。经等电聚焦电泳、十二烷基硫酸钠—聚丙烯酰胺电泳、双向免疫扩散等方法鉴定了纯度。以载脂蛋白 C I 和 C II 纯品免疫 BALB/C 小鼠, 应用淋巴细胞杂交瘤技术建立了 4 株抗人载脂蛋白 C I 和 2 株

抗人载脂蛋白 C II 杂交瘤细胞。所得单克隆抗体与载脂蛋白 A I、A II、B、C I、E 和白蛋白等无交叉反应。

关键词 载脂蛋白 C I ; 载脂蛋白 C II ; 单克隆抗体 ; 高效液相色谱

载脂蛋白 C I 和 C II 主要分布在血浆极低密度脂蛋白 (very low density lipoprotein, VLDL)、高密度脂蛋白 (high density lipoprotein, HDL) 及乳糜微粒中。研究表明, C I 有激活卵磷脂胆固醇乙酰基转移酶的作用^[1], 并有抑制肝脂肪酶活性^[2]及影响内皮细胞生长的作用^[3]。在体外实验中, 载脂蛋白 C II 可以抑制载脂蛋白 C II 对脂蛋白脂酶的激活作用^[4], 并可抑制肝脏对富含甘油三酯脂蛋白的摄取^[5]; 在高甘油三酯血症患者中也观察到载脂蛋白 C II /C III 比例下降^[6]。载脂蛋白 C II 分子被不同程度唾液酸化, 而呈现出三种亚型: C II₀、C II₁ 和 C II₂^[7], 各亚型比例不同可能与高甘油三酯血症有密切关系^[8]。各种载脂蛋白 C 亚类可能是通过同一条途径代谢的^[9], 它们共同作用, 参与脂蛋白代谢的调节。

载脂蛋白 C I 和 C II 在血中含量低, 且分布在不同的脂蛋白组分中^[10], 分离提纯有一定困难。由于其分子量小, 抗原性弱, 较难制备单克隆抗体 (monoclonal antibody, McAb)。我们在成功制备抗人载脂蛋白 C II McAb 的基础上^[11], 应用高效液相色谱法 (high performance liquid chromatography, HPLC) 分离了载脂蛋白 C I 和 C II, 并制备了 McAb。

1 材料与方法

1.1 人血清极低密度脂蛋白的分离

* 国家自然科学基金资助课题(3880394)

① 空军石家庄医院病理科, 石家庄 050081

人血清在 $d=1.006 \text{ kg} \cdot \text{L}^{-1}$ 下 $182\,000 \times g$ 5°C 离心 24 小时, 收集顶层 VLDL, 冷冻干燥。

1.2 脱脂

冻干的 VLDL 用乙醇: 乙醚(3:1, V:V)液抽提 2 次, 再用纯乙醚洗一次, 所得极低密度载脂蛋白溶于 $0.03 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris- $6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尿素中(pH 8.0)。

1.3 载脂蛋白 Cs 的提取

Sephadex G-75 凝胶过滤。柱床 $1.6 \text{ cm} \times 180 \text{ cm}$, 洗脱液为 $0.03 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris- $6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尿素(pH 8.0)。流速 $30 \text{ ml} \cdot \text{h}^{-1}$ 。收集载脂蛋白 Cs 峰, 透析, 冷冻干燥。

1.4 各载脂蛋白 C 亚类的分离纯化

冻干的载脂蛋白 Cs 溶解于 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris- $6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尿素中(pH 8.0)。HPLC 分离。色谱柱为 protein pak DEAE 5 pw($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $7.5 \text{ mm} \times 10 \text{ mm}$, Waters 产品)。进样量 1 ml。样品蛋白浓度 $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。进样后先以 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris- $6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尿素洗脱, 待第一峰洗出后, 再用 $0 \sim 0.15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 连续梯度洗脱(含 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris- $6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尿素)。流速 $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, 收集各洗脱峰, 用 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NH_4HCO_3 透析。

1.5 载脂蛋白 C I 和 C II 的鉴定

1.5.1 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE) 凝胶浓度 10%, SDS 浓度 0.1%, 稳定电流 200 mA, 电泳 5 小时, 以 0.05% 考马斯亮兰 R-250 染色。以 4 种已知蛋白质作分子量标准。

1.5.2 等电聚焦电泳(isoelectric focusing, IEF)

凝胶浓度 6%, Ampholin 浓度 2%, 凝胶中含 $6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尿素。加样量 $20 \mu\text{l}$ 。阴极液 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH, 阳极液 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_3PO_4 , 控制功率 $1 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-1}$, 10°C , 电泳 30 h。

1.5.3 双向免疫扩散 提纯的载脂蛋白 C I 和 C II 样品与抗载脂蛋白 A I、A II 和 B 抗血清(本室制备), 抗载脂蛋白 C I、C II 和 C III 抗血清(华西医科大学生物化学教研室), 抗载脂蛋白 E 抗血清(日本第一化学株式会社)及抗人血清白蛋白抗血清(北京协和医院内分泌科)作双向扩散试验。按常规方法操作。

1.6 单克隆抗体的制备

1.6.1 免疫 200 μg 载脂蛋白 C I 或 C II 纯品, 与福氏完全佐剂乳化, 于小鼠皮下多点注射, 融合前 3 天以 300 μg 纯品脾内注射加强一次。

1.6.2 细胞融合和克隆化 免疫活化的脾细胞与

SP2/0 骨髓瘤细胞按 1:4 比例在 50% 聚乙二醇 6000 作用下融合。用酶联免疫测定法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)测定分泌抗载脂蛋白 C I 或 C II 抗体的阳性孔。选择强阳性的细胞, 以有限稀释法进行克隆化, 共克隆 4 次。待阳性率达 100% 后, 再行细胞扩大培养。

1.6.3 腹水的获得及 McAb 的制备 将单株抗载脂蛋白 C I 或 C II 细胞注射 BALB/C 小鼠腹腔, 10 天后收集腹水。50% 饱和硫酸铵沉淀法分离 McAb。

1.7 抗载脂蛋白 C I 和 C II 单克隆抗体鉴定

1.7.1 效价测定 用 ELISA 法。以载脂蛋白 C I 或 C II ($10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 包被酶标板, 4°C 过夜, 洗涤后加入不同稀释度的腹水, 37°C 1 小时后洗涤, 加入 HRP-羊抗鼠 IgG, 37°C 1 小时, 洗涤, 加底物显色。

1.7.2 特异性检测 用 ELISA 方法。以载脂蛋白 A I、A II、B、C I、C II、C III、E、VLDL、HDL 和白蛋白等(均为本室制备)包被酶标板, 过夜, 洗涤。加入 McAb, 37°C 2 小时, 洗涤。加入 HRP-羊抗鼠 IgG, 37°C 2 小时, 洗涤; 加底物显色。

1.7.3 McAb 亚类鉴定 取细胞培养上清液用 50% 饱和硫酸铵沉淀浓缩 30 倍, 以标准抗小鼠 IgA、IgM、IgG₁、IgG_{2a}、IgG_{2b} 和 IgG₃ 在琼脂上作免疫扩散, 观察形成的沉淀线。

2 结果

2.1 各载脂蛋白 C 组分的分离纯化

高效液相色谱法分离载脂蛋白 Cs 图谱如图 1。出现 5 个主要吸收峰。收集各峰以 SDS-PAGE 及等电聚焦电泳等方法鉴定, 判定峰 I 为载脂蛋白 C I, 峰 II、IV 和 V 分别为载脂蛋白 C II₀、C II₁ 和 C II₂。本结果与 Weisweiler P 的实验结果相符^[6]。

2.2 载脂蛋白 C I 和 C II 的纯度鉴定

2.2.1 SDS-PAGE 示载脂蛋白 C I 和 C II 只呈现一条带(Figure 2), 根据标准蛋白质的电泳结果, 求出蛋白质的 Rf 值与分子量的回归方程为:

$$Y = (\lg MW) = -1.319 \times Rf + 5.188$$

再根据载脂蛋白 C I 和 C II 的 Rf 值, 求出其分子量分别为 6 700 和 8 700 Da, 与文献报道的相近^[12,13]。

2.2.2 等电聚焦结果显示载脂蛋白 C I 和 C

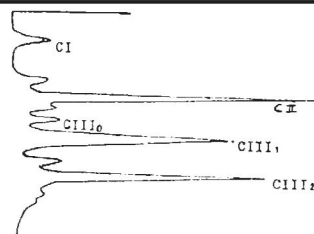
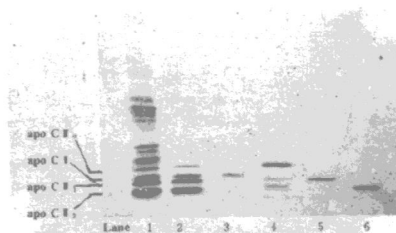


Figure 1. The elution profile of apo Cs in HPLC.

■ 已纯化 (Figure 3)。

2.2.3 双向免疫扩散结果表明提纯的载脂蛋白 C I 和 C ■ 只与相应的抗血清反应, 与抗载

Figure 3. Isoelectric focusing patterns of apo C. The pI range is 4~6. Lane 1 is apo-VLDL. Lane 2 is apo Cs. Lane 3 is apo C I. Lane 4 is apo C ■. Lane 5 is apo C II₁. Lane 6 is apo C II₂.

脂蛋白 A I、B、E、C ■ 和 C ■ (或 C I) 抗血清不反应。

2.3 载脂蛋白 C I 和 C ■ 的单克隆抗体鉴定

2.3.1 效价测定 4 株抗载脂蛋白 C I McAb 的腹水效价均为 $1:10^7 \sim 1:10^8$; 2 株抗载脂蛋白 C ■ McAb 腹水效价为 $1:3.2 \times 10^7$ 。

2.3.2 特异性检测 4 株抗载脂蛋白 C I McAb 只与载脂蛋白 C I、VLDL 和 HDL 反应, 2 株抗载脂蛋白 C ■ McAb 只与载脂蛋白 C ■、VLDL、HDL 反应。而与其他载脂蛋白及白蛋白无交叉反应 (Figure 4)。

2.3.3 McAb 亚类分析 4 株抗载脂蛋白 C I McAb 抗体亚类均为 IgG_{2b} 和 IgG_{2c}。

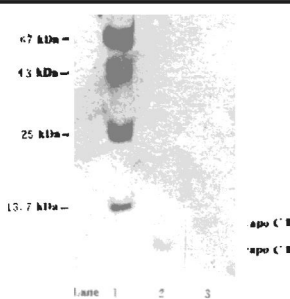


Figure 2. The SDS-PAGE pattern of apo C I and C II. Lane 1 is molecular weight standard, the MW of the bands are 67 kDa, 43 kDa, 25 kDa, 13.7 kDa respectively. Lane 2 is apo C I. Lane 3 is apo C II.

3 讨论

载脂蛋白 C I、C ■ 和 C ■ 含量低, 理化性质相近, 分离提纯有一定困难。有作者^[14-15]应用凝胶过滤柱层析、离子交换柱层析、聚焦柱层析及制备型等电聚焦等方法制备载脂蛋白 C I 和 C ■, 这些方法分离量大, 但费时费力, 回收率低, 且难以将载脂蛋白 C I 与 C ■ 有效分离。HPLC 法快速简便, 回收率高。有作者^[6]应用 HPLC 成功分离载脂蛋白 C I、C ■ 和 C ■。他们应用的方法多为先过凝胶过滤 HPLC 粗提载脂蛋白 Cs, 再经离子交换 HPLC 纯化各 C 亚类。考虑到凝胶过滤 HPLC 柱价格昂贵, 且寿命只有 1~2 年, 我们先将极低密度载脂蛋白过

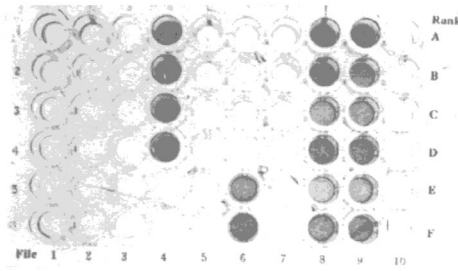


Figure 4. Analysis of the McAb to apo C I and apo C II by ELISA. Coating antigen: file 1~10 are apo A I, A I B, C I, C I, C II, E, VLDL, HDL, human albumin respectively. Tested McAb: Rank A~D are 4 clones of McAb to apo C I; rank E~F are 2 clones of McAb to apo C II

Sephadex G75 柱层析粗提载脂蛋白 Cs, 然后用离子交换 HPLC 纯化。这种方法可有效地分离载脂蛋白 C I、C I、C II、C II 和 C II₂。

载脂蛋白 C I 和 C II 的临床测定需要高效特异的抗血清。多克隆抗血清由于动物来源不同, 免疫效果各异, 不同批号抗血清的反应性可能不一致, 这会影响载脂蛋白 C I 和 C II 测定的稳定性, 影响结果的可比性。而 McAb 来源于同一细胞株, 针对同一抗原决定簇, 有稳定的反应性, 测定结果稳定可比。此外, 单克隆抗体还可用于载脂蛋白的结构功能关系研究^[4]。由于载脂蛋白 C I 和 C II 分子量小, 抗原性弱, 制备 McAb 难度很大。我们应用不同的免疫方法, 经过多次杂交融合, 成功地制备了载脂蛋白 C I、C II 特异的 McAb, 为进一步的研究工作奠定了基础。

参考文献

- 1 Albers JJ. Effect of human plasma apolipoproteins on the activity of purified lecithin:cholesterol acyltransferase. *Scand J Clin Lab Invest*, 1978, **150**: 48~52.
- 2 Kinnunen PKJ, Ehnholm C. Effect of serum and C-apoproteins from very low density lipoprotein on human postheparin plasma hepatic lipase. *FEBS Lett*, 1976, **65**: 354~357.
- 3 Tournier JF, Bayard F, Tauber JP, et al. Rapid purification and activity of apolipoprotein C I on the proliferation of bovine vascular endothelial cells *in vitro*. *Biochem Biophys Acta*, 1984, **804**(2): 216~220.
- 4 Brown WV, Baginsky ML. Inhibition of lipoprotein lipase by an apoprotein of human very low density lipoprotein. *Biochem Biophys Res Commun*, 1972, **46**: 375~382.
- 5 Windler E, Chao Y, Havel RJ. Regulation of the hepatic uptake of triglyceride-rich lipoproteins in the rat. *J Biol Chem*, 1980, **255**(17): 8 303~307.
- 6 Weisweiler P, Friedl C, Schwandt P, et al. Isolation and quantification of apolipoproteins C I, C II and C II₂ in very-low-density lipoproteins by "High-performance" anion-exchange chromatography. *Clin Chem*, 1986, **32**(6): 992~994.
- 7 Vaith P, Assmann G, Uhlenbruck G. Characterization of the oligosaccharide side chain of apolipoprotein C II from human plasma very low density lipoproteins. *Biochem Biophys Acta*, 1978, **541**(2): 234~240.
- 8 Holdsworth G, Stocks J, Dodson P, et al. An abnormal triglyceride-rich lipoprotein containing excess sialylated apolipoprotein C II. *J Clin Invest*, 1982, **69**: 932~939.
- 9 Huff MW, Fidge NH, Nestel PJ, et al. Metabolism of C-apoproteins: kinetics of C I, C II₁ and C II₂ and VLDL apolipoprotein B in normal and hyperlipoproteinemic subjects. *J Lipid Res*, 1981, **22**(8): 1 235~46.
- 10 Antonio M, Gotto Jr, Henry J, et al. Intradermal introduction of the plasma lipoproteins. In: Segrest JP, Albers JJ (ed). *Methods in Enzymology, Vol 128, Plasma Lipoproteins, Part A, Preparation, Structure and Molecular Biology*. Orlando, Florida USA: Academic Press Inc, 1986; 3~40.
- 11 黎健, 陈文祥, 蒋雷, et al. 人血清载脂蛋白 C II 的分

- 离纯化及其单克隆抗体的制备. 生物化学与生物物理学报, 1992, 24 (1): 40~47.
- 12 Brewer HB. The complete amino acid sequence of alamine apolipoprotein (apo C II), an apolipoprotein from human plasma very low density lipoproteins. *J Biol Chem*, 1974, 249: 4 975~81
 - 13 Shulman RS. The complete amino acid sequence of I (apo Lp-ser), an apolipoprotein from human very low density lipoproteins. *J Biol Chem*, 1975, 250: 182~187
 - 14 Herbert PN, Forte TM, Shulman RW, et al. Praction of the C-apoproteins from human plasma very low density lipoproteins. *J Biol Chem*, 1973, 248: 4 941~46.
 - 15 McLeod R, Lacko AG, Pritchard PH, et al. Purification of biologically active apolipoproteins by chromatofocusing. *J Chromat*, 1986, 381: 271~283.
 - 16 Krul ES, Oida K, Schonfeld G. Expression of a monoclonal antibody-defined aminoterminal epitope of human apo C- I on native and reconstituted lipoproteins. *J Lipid Res*, 1987, 28(7): 818~827.
- (本文 1995-07-27 收到, 1995-11-22 修回)

关于中文稿件中名词术语使用外文缩写的规定

《中国动脉硬化杂志》编辑部

当一个多个字的名词术语在中文稿件中反复出现时,作者往往喜欢用一个外文缩写来代替;这样做,既节省篇幅,又避免繁琐重复,为多数期刊所称颂,本刊亦不例外。然而我们在编辑工作中发现,由于受作者层次和参考文献种类等因素的影响,在使用名词术语的外文缩写时存在以下问题:①同一个英文词,译成的中文不同,如 derived 这个词,有的译成源性,有译为衍化,还有的译成衍生;②缩写不规范,字母大小写不一致,如载脂蛋白(apolipoprotein),缩写为 apo 已不规范,而它却有 Apo 和 apo 两种写法;③用法不当,有的用在文题中,有的用作关键词,有的名词术语仅两三个汉字,为图方便,个别作者也用缩写来代替,而且,第一次出现时,没有汉英对照,只有缩写,这是极不应该的。有鉴于此,为求统一,本刊对中文稿件中名词术语使用外文缩写来代替作如下规定,请作者遵照执行。

- 1 名词术语在 3 个(含 3 个)汉字内,一律使用中文;多于 3 个汉字的,可使用外文缩写;如胆固醇、脂蛋白、内皮素、高血压、糖尿病、再狭窄等,都只能用中文;但冠心病、肺心病等例外。
- 2 文题、摘要和关键词中的名词术语,不得使用外文缩写来代替。
- 3 正文中的各级标题不得用缩写来代替名词术语。段首和句首的名词术语,也不得用缩写来代替。
- 4 第一次使用外文缩写来代替名词术语时,必须按照下列格式来写:中文(外文,缩写)。如极低密度脂蛋白胆固醇(very low density lipoprotein cholesterol, VLDLC)、动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)等,以下

行文,可只写缩写,不必注释中文。

5 名词术语的外文缩写原则

- 5.1 由两个或两个以上的词构成的名词术语,缩写时一律取实词首字母,全大写;如总胆固醇(total cholesterol, TC)。
- 5.2 由主干词加前缀构成的单词名词术语缩写时,不论主干词和前缀之间是否有连字符,一律取前缀和主干词的首字母,全大写,如去甲肾上腺素(norepinephrine, NE)。
- 5.3 组合法构成的单词名词术语,其间若没有连字符,缩写时取首字母和另 1~2 个字母,首字母大写,余小写,如动脉粥样硬化(atherosclerosis, As),但相沿成习的写法例外,如动脉硬化(arteriosclerosis, AS)、甘油三酯(triglyceride, TG)、白细胞介素(interleukin, IL)等。
- 5.4 组合法构成的名词术语,其间有连字符的,按照上述第 5.1 条原则缩写。
- 5.5 用来代替中文名词术语的外文缩写,在中文稿件中不用复数。
- 5.6 缩写字母之间不用连字符;若词末有数字,可在数字与左邻字母之间加连字符(用半字线),如 IL-1。
- 6 书写、打字或排版时,名词术语的外文缩写不移行。

以上规定,自 1994 年 10 月 1 日起生效;此后,凡文稿中有不符合规定者,本刊将退回作者重写,直到符合本规定为止。

(胡必利起草、修订)