

· 方法技术 ·

# 人血清载脂蛋白 AI 的大量分离、纯化及鉴定

张春艳      林学颜

(中山医科大学免疫学教研室, 广州 510089)

## Isolation, Purification and Characterization of Human Serum Apolipoprotein AI

ZHANG Chun-Yan and LIN Xue-Yan  
(Department of Immunology, Sun Yat-Sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510089, China)

**ABSTRACT** Apolipoprotein AI (apo AI) was separated and purified from human serum by precipitation with dextran sulphate 500 (DS 500), density gradient zonal ultracentrifugation, delipidation and Sephadex G-150 gel permeation chromatography. Identifying by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and analytical isoelectric focusing (IEF), the purified apo AI shows only one band on SDS-PAGE, and the molecular weight is 28 180. With DS 500 sedimentation, this method saves time for ultracentrifugation, which is much valuable for large-amount purification of apo AI.

**KEY WORDS** Apolipoprotein AI; Ultracentrifugation; Electrophoresis; Permeation chromatography

**摘要** 采用正常人血清为原料,利用硫酸右旋糖酐浓缩血清、密度梯度区带离心、脱脂和 Sephadex G-150 柱层析技术,获得人血清载脂蛋白 AI 的纯品,经十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳、等电聚焦电泳、分子量测定等证明,所提取的载脂蛋白 AI 为纯品,分子量为 28 180。本方法的优点是,通过浓缩血清,减少了离心次数,缩短了制备时间,且分离效果好,为大量制备纯净的载脂蛋白 AI 提供了一种新的方法。

**关键词** 载脂蛋白 AI; 超速离心; 电泳; 层析

载脂蛋白 AI 是高密度脂蛋白 (high density lipoprotein, HDL) 的主要组分。HDL 颗粒中

蛋白质占 50%, 而载脂蛋白 AI 占蛋白质其中的 70%<sup>[1]</sup>。研究结果表明,高密度脂蛋白及载脂蛋白 AI 水平与动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 及冠心病 (coronary heart disease, CHD) 呈负相关<sup>[2]</sup>。血清中载脂蛋白 AI 含量十分丰富,其浓度为 1.0~1.2 mg/L。载脂蛋白 AI 通过两个机制参与胆固醇从肝外组织向肝脏的逆转运:一个是促进胆固醇从组织细胞向外流出;另一个是激活卵磷脂胆固醇酰基转移酶 (lecithin-cholesterol acyltransferase, LCATase)<sup>[3]</sup>。在哺乳动物,载脂蛋白 AI 由肝脏及小肠合成。载脂蛋白 AI 是由 243 个氨基酸组成的单链多肽,分子量为 28 180,分子组成中不含半胱氨酸和异亮氨酸。经等电聚焦 (isoelectric focusing, IEF) 电泳发现,载脂蛋白 AI 有数种分子异构体 (molecular isomer),其中两种主要的分子同型体 AI<sub>1</sub> 和 AI<sub>2</sub> 的等电点分别为 6.62 和 5.53。目前,对载脂蛋白 AI 的研究已经深入到分子水平,载脂蛋白 AI 基因已被分离,其 DNA 顺序已经测定<sup>[4]</sup>,人们正在探索载脂蛋白 AI 基因的遗传变异与 As 及 CHD 发生的关系。进行载脂蛋白 AI 的研究,首先必须有载脂蛋白 AI 的纯品,本文报道一种大量分离提纯载脂蛋白 AI 的新方法。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

- 1.1.1 血清 收集正常新鲜混合人血清。
- 1.1.2 硫酸右旋糖酐 500 Sigma Chemical Company 产品。
- 1.1.3 标准分子量蛋白 14 400~94 000, Pharmacia Fine Chemicals 产品。
- 1.1.4 葡萄糖凝胶 G-150 Pharmacia 进口分装。

## 1.2 人血清高密度脂蛋白的分离提纯

1.2.1 硫酸右旋糖酐沉淀高密度脂蛋白<sup>[5]</sup> 于收集的正常混合人血清中加入1%的硫酸右旋糖酐(dextran sulfate, DS)和2 mol/L CaCl<sub>2</sub>溶液,使其终浓度分别为0.05%和0.1 mol/L,4℃过夜,离心(5 000 r/min, 4℃, 30 min),取上清,加入DS和CaCl<sub>2</sub>使其终浓度分别为0.75%和0.2 mol/L,离心(5000 r/min, 4℃, 30 min),弃上清,将沉淀溶于12% NaCl溶液中,再加入0.02 mol/L Tris-HCl、DS和CaCl<sub>2</sub>使其终浓度分别为0.75%及0.2 mol/L,再离心,以上步骤重复一次以除去杂蛋白,离心,弃上清,沉淀溶于0.5 mol/L的K<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>,离心(15 000 r/min, 4℃, 30 min),所获上清即为高密度脂蛋白。

1.2.2 超速离心分离高密度脂蛋白 加固体NaBr至DS浓缩的高密度脂蛋白中,用Abell折光仪调密度至1.32 g/ml,按Table 1将梯度液及样品加入离心管中,用日立65 P-7制备型离心机,RPZ 48T区带转头,离心42 000 r/min, 15℃, 10 h。离心毕,自然降至3 000 r/min,由边缘孔注入NaBr液( $d=1.40$  g/ml),出样,由中心孔收集样品,每管10 ml,用Abell折光仪测各管折光系数,换算成密度,收集 $d=1.09\sim 1.21$  g/ml各管,合并透析。

Table 1. Preparative density gradient zonal ultracentrifugation

Density(g/ml)	volume(ml)
1.0	100
1.1	100
1.2	200
1.3	100
1.32	100
1.4	60

## 1.3 高密度脂蛋白脱脂得载高密度脂蛋白<sup>[6]</sup>

透析后的高密度脂蛋白滴入-20℃预冷的丙酮:无水乙醇(1:1, v/v)混合液中,搅拌30 min,置-20℃过夜,离心(5 000 r/min, -10℃, 15 min),离心沉淀按上法重复二次后用无水乙醇少许洗一次,沉淀真空干燥,脱脂后的载高密度脂蛋白以10 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0)-6 mol/L 尿素-1 mmol/L 乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)溶解,4℃下轻轻搅拌20 h。

## 1.4 凝胶过滤柱层析分离载脂蛋白 AI

取Sephadex G-150 20 g用蒸馏水充分膨胀,反复漂洗,装柱(2.5 cm×100 cm),用10 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0)-6 mol/L 尿素-1 mmol/L EDTA洗脱液煮沸3 h以上,使凝胶充分膨胀,装柱(2.5 cm×100 cm),用约2~3个柱床体积的洗脱液平衡凝胶柱,将载高密度脂蛋白10 ml加入凝胶柱,用洗脱液进行洗脱,流速9 ml/h,每管3 ml分部收集。

## 1.5 载脂蛋白 AI 纯度鉴定及分子量测定

1.5.1 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳<sup>[7]</sup> 成层胶:T=3%,C=2.6%,pH 6.8;分离胶:T=12.5%,C=2.6%,pH 8.8,电极缓冲液pH 8.5的Tris。甘氨酸,电流40 mA下电泳2 h,电泳后用0.1%考马斯亮兰R-250,50%甲醇,10%冰乙酸染色3 h,然后以50%甲醇,10%冰乙酸脱色。

1.5.2 分子量测定 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)后标记溴酚兰的位置,脱色染色后测量溴酚兰、标准分子量蛋白中各组份及载脂蛋白AI的迁移距离,计算各蛋白带的相对迁移率(relative mobility, RM)。RM=各蛋白迁移距离/溴酚兰迁移距离,求出分子量对数值与其RM的回归方程,并绘出标准曲线,根据载脂蛋白AI的RM值求出其分子量。

## 1.6 载脂蛋白 AI 等电点的测定

1.6.1 等电聚焦电泳 取高密度脂蛋白AI 100 μg,载脂蛋白AI 50 μg作圆盘等电聚焦电泳,凝胶含7.5%丙烯酰胺,8 mol/L 尿素和pH 4~6的载体两性电解质,下槽(正极)用10 mmol/L 磷酸缓冲液,上槽(负极)用20 mmol/L NaOH缓冲液,恒压250 V电泳18 h,用0.04%考马斯亮兰G-250,3.5% HClO<sub>4</sub>染色2 h后,以5%的冰乙酸脱色。

1.6.2 载脂蛋白 AI 等电点的测定 在进行IEF电泳时,以一根不加样品的凝胶作对照,电泳后测量其长度,从负极到正极切成5 mm长的片段,放入盛有1 ml蒸馏水(pH 7.0)的小试管中浸泡过夜,次日测各管pH值,求出反映各片段距阴极距离与其pH关系的回归方程,测量含载脂蛋白AI凝胶染色脱色后的长度及各蛋白带距阴极的长度,根据回归方程计算出各种载脂蛋白AI分子异构体的等电点。

## 2 结果

### 2.1 凝胶过滤柱层析分离载脂蛋白 AI

载高密度脂蛋白经 Sephadex G-150 凝胶柱层析后, 出现 4 个主要紫外吸收峰(Figure 1), 经 SDS-PAGE 鉴定得知: 峰 1 主要成份是清蛋白, 峰 2 主要成分为纯净的载脂蛋白 AI, 峰 3 为载脂蛋白 A II 及少量载脂蛋白 C, 峰 4 则主要为载脂蛋白 Cs。

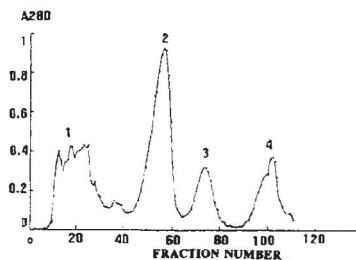


Figure 1. Gel permeation chromatography column profile of apo HDL. 1=human serum albumin, 2=apo AI, 3=apo A II, 4=apo Cs



Figure 2. SDS-PAGE of apo AI in 12.5% polyacrylamide. M = molecular weight markers (14 400~94 000); AI = apo AI

2.2 纯度鉴定及分子量测定

2.2.1 纯度鉴定 SDS-PAGE 结果见 Figure 2, 载脂蛋白 AI 只呈现一条带, 说明为纯

品。

2.2.2 分子量测定 各标准分子量对数值(logarithm of molecular weight, Log MW)及其相对迁移率 RM 可见 Table 2。测得载脂蛋白 AI 的分子量为 28 180, 与文献报道一致。以 Log MW 为纵坐标, RM 为横坐标做出标准曲线, 标出所测蛋白(载脂蛋白 AI)的位点, 见图 3。

Table 2. Correlation between logarithm of molecular weight (Log MW) and relative mobility RM calibration kit standards.

	Subunit $\times 10^3$	Log MW	RM
PKase B	94	4.973	0.149
albumin	67	4.826	0.207
ovalbumin	43	4.533	0.407
CAase	30	4.477	0.520
TI	20.1	4.301	0.689
$\alpha$ -LA	14.4	4.146	0.843

PKase B = phosphorylase B; CA = carbonic anhydrase; TI = trypsin inhibitor;  $\alpha$ -LA =  $\alpha$ -lactalbumin.

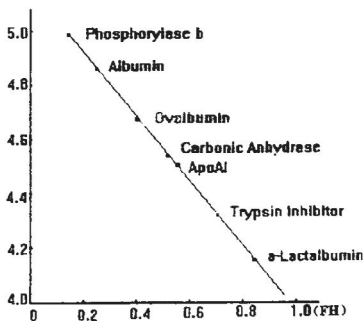


Figure 3. Regression curve of LMV calibration Kit in 12.5% acrylamide, and the location of apo AI.

2.3 载脂蛋白 AI 等电点的测定

2.3.1 等电聚焦电泳 结果见 Figure 4, 分子量为 28 180 的载脂蛋白 AI 在 IEF 电泳图谱

上出现 4~8 条带,为它们的分子异构体。

2.3.2 等电点测定 测得的载脂蛋白 AI 四种主要分子异构体等电点分别为 5.87, 5.79, 5.71, 5.66, 与文献报道一致。以各片段距阴极距离(D)为横坐标,相应的 pH 值为纵坐标,得出标准曲线,并标出载脂蛋白 AI 四种主要分子异构体的位点,见 Figure 5。

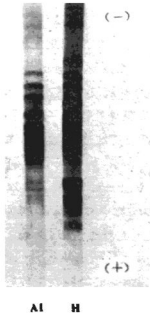


Figure 4. IEF gel electrophoresis of apo AI in pH4~6 gradient, 7.5% polyacrylamide. H=apo HDL; AI=apo AI

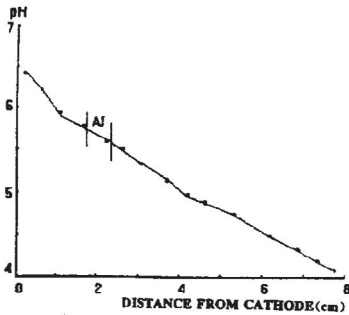


Figure 5. Determination of pH gradient profile on a 7.5% polyacrylamide gel containing Ampholin 4~6, and the location of the purified apo AI.

载脂蛋白 AI 是人血清高密度脂蛋白中的主要载脂蛋白,占高密度脂蛋白中蛋白质的 70%。分离载脂蛋白 AI,第一步要分离出高密度脂蛋白,高密度脂蛋白密度较大,为 1.063~1.21 g/ml,上浮速度小,不易分离,需采用超速离心,本实验用硫酸右旋糖酐沉淀高密度脂蛋白,继而进行超速离心,这样就浓缩了血清,减少了离心次数,有利于大量制备。超速离心分离高密度脂蛋白一般采用角转头,采用角转头时必须转头静止时才能将样品取出,由于离心管和梯度液在转动和静止时处于不同位置,因而对已分离的样品界面有所扰动,不易达到理想效果。本实验采用区带转头,加样出样都在运转中进行,对已分离的样品界面不予干扰,得到了较好的分离效果。从高密度脂蛋白的载脂蛋白中分离纯化载脂蛋白 AI 的方法较多,一般采用 Sephadex G-200 凝胶过滤柱层析。Sephadex G-200 抗静压能力小,洗脱时流速小,分离所用时间长,且往往因流速及压差调节不当而使柱子压实,造成样品不能洗出,使整个实验失败。本实验采用 Sephadex G-150 分离载脂蛋白 AI, Sephadex G-150 抗静压能力大,洗脱时流速大,减少了实验时间,且不易使柱子压实,分离效果理想,适用于大量分离。

参考文献

- 1 Breslow JL. Apolipoprotein genetic variation and human disease. *Physiol Rev*, 1993, 68: 85.
- 2 Reinhart RA, Arbdit MR, Gani K, et al. Apolipoprotein AI and B as predictor of angiographically defined coronary artery disease. *Arch Intern Med*, 1990, 150: 1 629.
- 3 Rall SC, Weisgraber KH, Mahley RW, et al. Abnormal lecithin cholesterol acyltransferase activation by a human apolipoprotein AI variant in which a singelysine residue is deleted. *J Biol Chem*, 1984, 259, 10 063.
- 4 Shouliera CC, Kornblitr AR, Munro BS, et al. Gene structure of human apolipoprotein AI. *Nucl Acid Res*, 1983, 2 827.
- 5 张英璐, 王忠, 王克勤, 等. 人血清脂蛋白的超速离心分离 I. 人血清极低密度及低密度脂蛋白的大量分离. *生物化学与生物物理学报*, 1982, 14: 1
- 6 Warmick GR. Gel isoelectric focusing method for specific diagnosis of familial hyperlipoproteinemia type 3. *Clin Chem*.

3 讨论

1979, 25(2): 279.

7 Stephens RE. High-resolution preparative SDS-polyacrylamide gel electrophoresis; Fluorescent visualization and

electrophoretic elution-concentration of protein bands. *Anal Biochem*, 1975, 65: 369.

(1996-02-01 收到, 1996-05-25 修回)