

人血清高密度脂蛋白亚类免疫印迹检测法

吴新伟 傅明德 刘秉文 邓 萍

(华西医科大学载脂蛋白研究室, 成都 610064)

主题词 脂蛋白, 高密度; 亚类; 电泳; 免疫印迹; 血清

摘要 为了检测血清高密度脂蛋白各亚类, 采用琼脂糖及梯度聚丙烯酰胺凝胶双向电泳、免疫印迹试验和斑点扫描分析建立了血清高密度脂蛋白亚类的检测方法。高密度脂蛋白各亚类含量重复性试验的板间变异系数为 4.9% ~ 11.1%, 正常人血清测得的高密度脂蛋白_{2b}、_{2a}、_{3a}、_{3b}、_{3c}亚类含量分别为 30.84% ± 6.95%、21.60% ± 3.88%、20.28% ± 3.69%、13.54% ± 2.03% 及 7.05% ± 1.75%, 前 β₁ 高密度脂蛋白和前 β₂ 高密度脂蛋白含量分别为 6.67% ± 1.22% 及 4.52% ± 1.12%。结果表明所建立的方法可直接以血清为样品, 同时准确检测 α 及前 β 高密度脂蛋白各亚类的组成及含量。

The Immunodetection Method of High Density Lipoprotein Subclasses in Human Serum

WU Xin-Wei, FU Ming-De, LIU Bing-Wen and DENG Ping

(Apolipoprotein Research Laboratory, West China University of Medical Sciences, Chengdu 610041, China)

MeSH Lipoprotein, HDL; Subclasses; Electrophoresis; Immunoblotting; Serum

ABSTRACT **Aim** An immunodetection method was developed to determine the contents of serum HDL subclasses. **Methods** High density lipoprotein (HDL) subclasses in human serum were separated by two-dimensional agarose-gradient polyacrylamide gel electrophoresis, the molecular size and mass of the HDL subclasses were determined by immunoblotting test and density scanning. **Results** The variation coefficients of the contents of the HDL subclasses are 4.9% ~ 11.1%. The contents of HDL_{2b}, HDL_{2a}, HDL_{3a}, HDL_{3b}, HDL_{3c} in normal lipidic serum are 30.80% ± 6.95%, 21.60% ± 3.88%, 20.28% ± 3.69%, 13.54% ± 2.03%, 7.05% ± 1.75%, respectively; and that of pre β₁-HDL and pre β₂-HDL are 6.67% ± 1.22%, 4.52% ± 1.12%, respectively. **Conclusion** The results suggested the method developed could be used to determine the contents of α-HDL and pre-β HDL subclasses in serum sample.

研究发现高密度脂蛋白 (high density lipoprotein, HDL) 含有 α-HDL (HDL_{2b}、HDL_{2a}、HDL_{3a}、HDL_{3b} 及 HDL_{3c}) 及前 β-HDL (前 β₁-、前 β₂- 及前 β₃- HDL) 等亚类^[1,2], 而且 HDL 由新生到成熟的代谢过程, 就是前 β₁-HDL → 前 β₂-HDL → 前 β₃-HDL → HDL₃ → HDL₂ 逐步递变的过程^[3]。近期研究还发现, 新生的前 β-HDL 在外周细胞胆固醇的移出和转移过程中起着十分重要的作用^[4,5]。因此, 建立一种无需超速离心分离即可同时准确检测血清中 HDL 各亚类, 特别是前 β-HDL 亚类组成及含量的方法, 对于深入研究 HDL 抗动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 的分子机理及其高脂血症、动脉粥样硬化疾病的诊断和防治有着重要的意义。

1 材料与方法

1.1 材料

正常人血清取自献血员; 分子量标准蛋白 (甲状

腺球蛋白、铁蛋白、牛血清白蛋白) 为 Sigma 公司产品; PVDF-Western 杂交膜为宝灵曼公司产品; 四甲基联苯胺为 Merck 公司产品; HRP-羊抗人载脂蛋白 AI IgG 为本室自制; GDS 8000 凝胶成像及分析系统为 UVP 公司产品。

1.2 琼脂糖凝胶电泳

取 10 μL 受试者血清, 在 0.7% 琼脂糖凝胶 (pH 8.6、0.05 mol/L 巴比妥缓冲液配制) 板上经 4 mA/cm 电泳 1.5 h。电泳结束后沿电泳方向将含脂蛋白区带的胶条切下 (1 cm × 3 cm), 并在胶条的靠负极侧中线处浸加 2 μL 标准蛋白液, 然后按以下方法作第二向电泳。

1.3 梯度聚丙烯酰胺电泳

用 pH 8.4、0.09 mol/L Tris-硼酸缓冲液分别配制 2% 及 30% 丙烯酰胺液, 通过梯度混合器制备 2% ~ 30% 梯度聚丙烯酰胺凝胶。将琼脂糖电泳胶条插入梯度凝胶板的上部, 用 0.7% 琼脂糖封口, 在 20 V/cm 下再沿第一向电泳垂直方向进行第二向电泳 24 h。

1.4 免疫印迹试验

剥离聚丙烯酰胺凝胶,按 Southern 等^[6]的方法将凝胶中的蛋白质通过毛细作用转移吸附到 PVDF 膜上。次日于室温下将杂交膜在 0.03% 戊二醛溶液中振摇 1 h 固定蛋白,用水洗去残余的戊二醛后,以 0.1% 丽春红染液染色,并用防水记号笔标示出标准蛋白条带的位置,然后用水洗去膜上的丽春红染料,再用 0.02 mol/L 的 PBS(PBST, pH 7.4, 含 0.05% Tween-20)配制的 5% 脱脂牛奶在 37℃ 保温振摇 3 h,封闭非特异性结合位点。膜用 PBST 洗涤 3 min × 3 次后,与 HRP-羊抗人载脂蛋白 AI IgG(1:250)在 37℃ 振摇保温 3 h,再洗 3 次,用含 0.01% 四甲基联苯胺和 0.03% 过氧化氢的 PBS(pH 5.2, 0.1 mol/L)显色半分钟,膜用清水漂洗后风干,最后用 GDS 8000 凝胶成像及分析系统扫描。HDL 各亚类的含量由其扫描峰的积分值确定;HDL 各亚类颗粒大小则由已知分子直径的标准蛋白迁移率制作的标准曲线确定。

2 结果

2.1 双向电泳-免疫印迹试验

从图 1 及图 2 (Figure 1 and 2) 可见,血清 HDL 经琼脂糖凝胶电泳后分为 α-HDL 及前 β-HDL 两条区带,再经梯度凝胶电泳后,α-HDL 分为 HDL_{2b}、

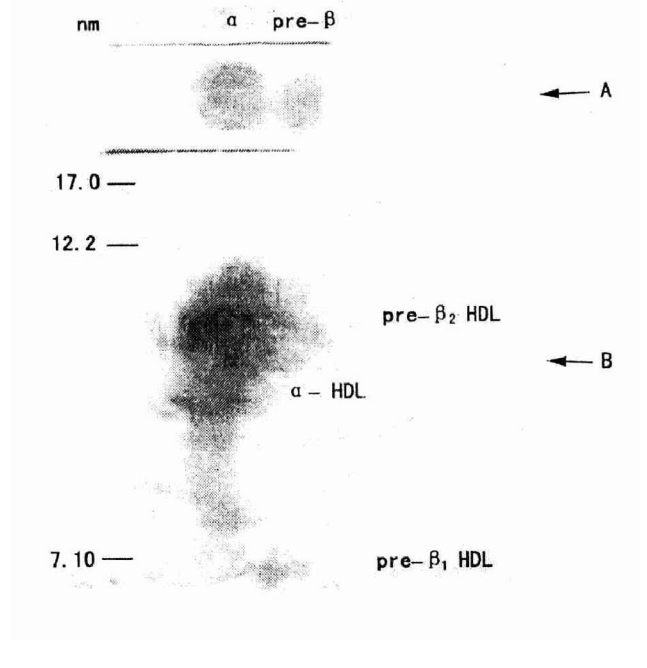


图 1. 正常人血清双向电泳-免疫印迹试验图谱
Figure 1. Western blot of normal serum after two-dimensional electrophoresis. A: Western blot after agarose electrophoresis; B: Western blot after two-dimensional electrophoresis; Mw standard proteins: thyroglobulin (17 nm), ferritin (12.2 nm), BSA (7.1 nm)

HDL_{2a}、HDL_{3a}、HDL_{3b}及 HDL_{3c}五条区带,前 β-HDL 可分为前 β₁-HDL 及前 β₂-HDL 两条区带,图中未见前 β₃-HDL 区带。此外,高脂血症患者(总胆固醇为 5.57 mmol/L,甘油三酯为 5.37 mmol/L)血清双向电泳-免疫印迹图谱中(图 3, Figure 3),HDL_{3a}及 HDL_{3b}颗粒含量明显增多,而 HDL_{2b}颗粒含量明显减少,表明高脂血症患者 α-HDL 亚类颗粒直径有减小的趋势。

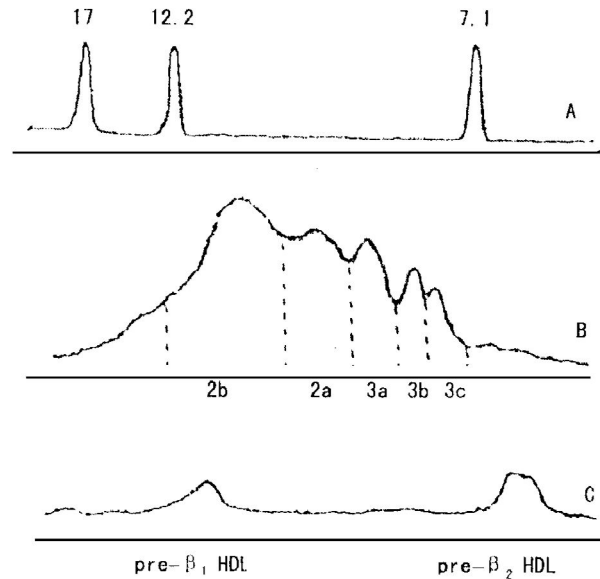


图 2. 正常人血清双向电泳-免疫印迹试验扫描图谱
Figure 2. Density scans of western blot membrane of normal serum. A: Mw standard protein; B: α-HDL; C: pre-β HDL

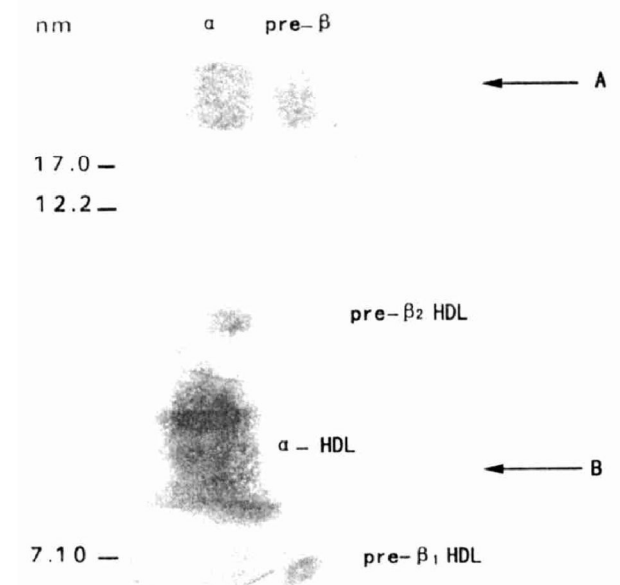


图 3. 高脂血症患者血清双向电泳-免疫印迹试验图谱
Figure 3. Western blot of hyperlipidemic serum after two-dimensional electrophoresis. A: Western blot after agarose electrophoresis; B: Western blot after two-dimensional electrophoresis

2.2 重复性试验

从表 1(Table 1) 可见, 本法测定的 HDL 亚类含量板间变异系数为 4.9% ~ 11.1%。

表 1. 板间重复性试验

Table 1. Variation coefficients of the contents of the HDL subclasses ($\bar{x} \pm s$, %, $n = 5$)

HDL subclasses	Content	CV
pre β_1 - HDL	6.79 \pm 0.64	9.4
pre β_2 - HDL	4.87 \pm 0.48	9.8
HDL _{3c}	7.97 \pm 0.39	4.9
HDL _{3b}	14.38 \pm 0.89	6.2
HDL _{3a}	18.88 \pm 1.38	7.3
HDL _{2a}	20.03 \pm 2.23	11.1
HDL _{2b}	27.14 \pm 2.15	7.9

2.3 高密度脂蛋白亚类组成及含量

从表 2 (Table 2) 可见, 正常人 α - 及前 β - HDL 各亚类含量及颗粒大小均与文献[1, 2] 报道一致。

表 2. 正常人血清高密度脂蛋白亚类组成及含量

Table 2. Contents of HDL subclasses of normal serum ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

HDL subclasses	Diameter (nm)	Content (%)
pre β_1 - HDL	5.80 \pm 0.12	6.67 \pm 1.22
pre β_2 - HDL	11.15 \pm 0.21	4.52 \pm 1.12
HDL _{3c}	7.22 \pm 0.16	7.05 \pm 1.75
HDL _{3b}	8.06 \pm 0.18	13.54 \pm 2.03
HDL _{3a}	8.46 \pm 0.25	20.28 \pm 3.69
HDL _{2a}	9.68 \pm 0.27	21.60 \pm 3.88
HDL _{2b}	11.55 \pm 0.20	30.84 \pm 6.95

3 讨论

自从 1985 年 Kunitake 等^[7] 发现血浆中存在少量的前 β - HDL 以来, 前 β - HDL 一直是血浆脂蛋白研究的热点。由于前 β - HDL 脂质含量少, 密度大 ($d > 1.21$ kg/L), 用传统的超速离心方法不能将它与其它血浆蛋白分离^[3], 而且, 前 β_2 - HDL 颗粒大小又在 HDL₂ 的颗粒范围, 因此用简单的电泳、分子筛层析或单向电泳免疫印迹试验均不能确定血浆 HDL 全部亚类的组成及含量。本文通过琼脂糖-

梯度聚丙烯酰胺凝胶双向电泳, 再结合免疫印迹试验, 测定前 β - 及 α - HDL 全部亚类的组成及含量。测定时直接以血清为样品, 先通过第一向琼脂糖电泳, 按 HDL 颗粒的表面电荷差异, 将人血清 HDL 分为 α - HDL 及前 β - HDL 两个亚类; 再通过第二向梯度聚丙烯酰胺凝胶电泳, 按颗粒大小, 分别将 α - HDL 分为 HDL_{2b}、HDL_{2a}、HDL_{3a}、HDL_{3b} 及 HDL_{3c} 等亚类, 前 β - HDL 分为前 β_1 - HDL 及前 β_2 - HDL。在本实验中未见前 β_3 - HDL, 可能与其在血清中含量过低有关^[8]。分离后的 HDL 各亚类经与 HRP- 抗载脂蛋白 AI IgG 发生特异免疫学结合反应以及酶显色反应后用 GDS 8000 凝胶成像及分析系统扫描, 确定 HDL 亚类的组成、颗粒直径以及含量。同一血清重复测定, HDL 各亚类含量的板间变异系数为 4.9% ~ 11.1%, 表明本法有较好的重复性。本法检测的正常人 α - 及前 β - HDL 各亚类含量及颗粒大小均与 Asztalos^[1] 及 Miida 等^[2] 的报道一致。此外, 本法采用酶免疫试验, 无放射性污染, 简便可行, 易于在一般实验室推广。

参考文献

- Asztalos BF, Sloop CH, Wong L, et al. Two-dimensional electrophoresis of plasma lipoproteins: recognition of new apoAI-containing subpopulations. *Biochim Biophys Acta*, 1993, **1169** (3): 291-300
 - Miida T, Kawano M, Fielding CJ, et al. Regulation of the concentration of prebeta high density lipoprotein in normal plasma by cell membranes and lecithin: cholesterol acyltransferase activity. *Biochemistry*, 1992, **31** (45): 11112-11117
 - Barrans A, Jarspard B, Barbaras R, et al. Pre- β HDL: Structure and metabolism. *Biochim Biophys Acta*, 1996, **1300** (1): 73-85
 - Kawano M, Miida T, Fielding CJ, et al. Quantitation of prebeta-HDL-dependent and non-specific components of the total efflux of cellular cholesterol and phospholipid. *Biochemistry*, 1993, **32** (19): 5025-5028
 - Castro GR, Fielding CJ. Early incorporation of cell-derived cholesterol into prebeta-migrating high density lipoprotein. *Biochemistry*, 1988, **27** (1): 25-29
 - Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol*, 1975, **98** (3): 503
 - Kunitake ST, La Sala KJ, Kane JP. Apolipoprotein AI-containing lipoproteins with pre-beta electrophoretic mobility. *J Lipid Res*, 1985, **26** (5): 549-555
 - Francone OL, Gurakar A, Fielding CJ. Distribution and functions of lecithin: cholesterol acyltransferase and cholesteryl ester transfer protein in plasma lipoproteins. *J Biol Chem*, 1989, **264** (12): 7066-7072 (1998-11-18 收到, 1999-05-07 修回)
- (此文编辑 朱雯霞)