

牛血清载脂蛋白 A-I 的研究

王铁城

(哈尔滨铁路卫生学校, 150006)

陈保生

(中国医学科学院基础所生化室)

摘要 本文采用区带密度梯度超离心,国内首次分离得到牛的纯化高密度脂蛋白(HDL)。然后用 sephadex G-200 凝胶过滤,将其中的载脂蛋白分为三个组分。通过聚丙烯酰胺凝胶电泳分析,确认组分 II 为载脂蛋白 A-I (APO A-I),占 HDL 的 80—90%,测定其分子量为 27040 道尔顿,全部氨基酸组成中不含半胱氨酸。其 N 端是天冬氨酸。本文确认牛是含 APO A-I 较丰富的动物之一,同时也为提纯和分离 HDL 及 APOA-I 提供了可靠的方法。

为了研究动脉硬化的发病机理,近年国内外对于人、鸭、鸡等动物的 HDL 中的主要载脂蛋白进行了分离和鉴定^[2,5,9]。但国内尚未见对牛 HDL 和 APOA-I 分离的报道。虽然国外有人进行了牛脂蛋白的分离^[6]但主要是采用角头或水平转头分步上浮法。因此需要多次离心,而且时间长,分离样品少,分离面在停止离心时易被搅动。本文采用区带头密度梯度超离心,一次可分离得到纯的三种脂蛋白,并对 HDL 中的 APOA-I 进行了提纯、鉴定和氨基酸(AA)

组成的分析。

材 料 和 方 法

新鲜黄牛血清由北京牛羊肉联合加工厂提供。sephadex G-200 和标准分子量蛋白由 pharmacia 公司提供。制备超离心机为 Beckman L8-80 型。冷冻干燥机为 EF-03 型。紫外吸收检测仪为 GXS-01 型。高速氨基酸自动分析仪为日本产日立 835-50 型。免抗人 APOA-I 抗血清、DABITC 试剂及聚丙烯薄膜(3 × 3

cm) 等均由中国医科院基础研究所生化室提供。

(一) 牛血清的分离 取新鲜牛血, 室温静置 4 小时后, 3000rpm、离心 30 分, 得到新鲜牛清, 再加少量 NaN_3 , 置冰箱 4°C, 保存备用。

(二) 牛血清 HDL 的分离、提纯及鉴定 分离提纯参照王克勤方法^[1], 利用 Beckman L8-80 超速离心机、Ti14 区带转头, 最大容积 665 ml, 最高转数 4.8 万/分。在 3000rpm 时通过蠕动泵和加样头, 由周边孔加入 NaBr 梯度液, 然后加速到 4.1 万 rpm、4°C、离心 20 小时。自中心孔出样, 收集 60 管样品。最后测定每管的折光系数及光密度值 (OD_{280}) 纯度鉴定通过琼脂糖凝胶电泳法进行, 用氨基黑 10B 染色。

(三) 牛血清 HDL 的脱脂及鉴定 本文采用乙醚:乙醇 (V/V) 3:1, -20°C 脱脂二次, 并用无水乙醚洗一次, 得到 HDL 的载脂蛋白, 为了鉴定脱脂是否完全, 又测定了脱脂前后的各种脂类含量。用 Coomassie Blue 法(考马斯亮兰法) 测定了蛋白含量。用氯化铁法及酶法测定了胆固醇含量, 用钼兰法测定了磷脂含量, 用乙酰丙酮法测定甘油三酯含量。

(四) 牛 HDL 中 APOA-I 的分离、提纯及鉴定 牛 APOA-I 的分离是参照 Scanu 方法^[2]加以改进后进行的。首先将 APO HDL 溶于 0.1mol/L Tris-HCl · pH 7.4 (含 6mol/L 脲) 的缓冲液中, 然后将样品装入 sephadex G-200 层析柱中 (110cm × 2.5 cm) 并以上述缓冲液进行洗脱, 流速控制在 18.9ml/60 分, 同时用紫外监测仪连续监测, 以自动分步收集器定时定量收集洗脱液, 20 分钟可收集一管 6.3ml。然后分别测定各管的蛋白含量及 OD_{280} 值。最后将同一组分的各管合并在一起, 以 0.05 mol/L 的 NH_4HCO_3 透析、脱盐、浓缩及真空冷干, 然后放 -20°C 冰箱保存。上述洗脱峰产物的鉴定按王克勤方法^[2]修改的垂直板 SDS 电泳进行。同时又做了免疫双扩散。

(五) APOA-I 的分子量及 AA 组成分析和 N 末端测定 APOA-I 分子量计算是按

李宪周方法^[3]、用修改的 SDS 电泳作图得出的结果进行的。AA 组成分析是取样品 1mg, 先用 6(mol/L × 离子价数) 巯基乙酸、110°C 条件下水解 2 小时, 然后上样到 AA 自动分析仪中进行分析。半胱氨酸测定用过甲酸氧化法, 色氨酸测定用光谱法。APOA-I N 末端的测定是应用唐京京的 DABITC 微量法^[4]进行的。

结 果

(一) 牛血清 HDL 的分离、提纯及鉴定 牛血清 25ml, 经密度梯度区带超离心后, 共收

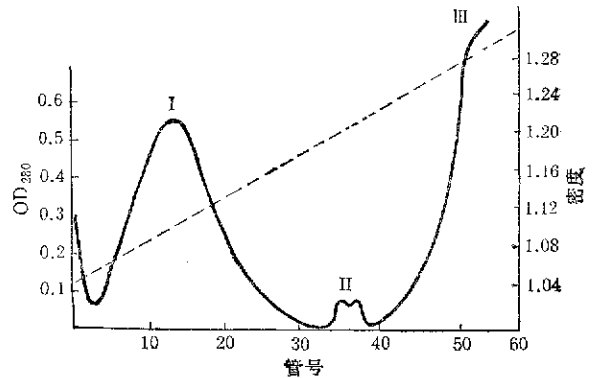


图1 牛血清脂蛋白区带超离心图 (峰 I VLDL + HDL 峰 II HDL 峰 III 其它杂蛋白)

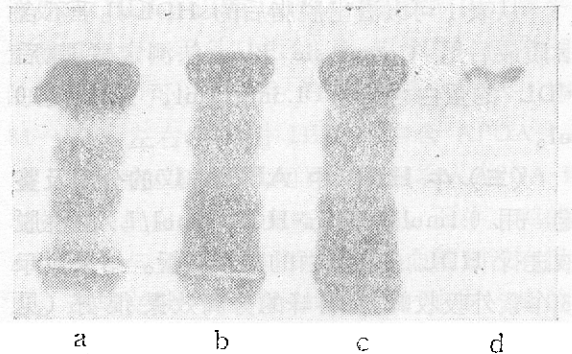


图2 牛血清 HDL 琼脂糖电泳图谱氨基黑 10B 染色 a、b、c 牛全血清; d. 牛血清中分离出的 HDL

集 66 管, 以测得的 OD_{280} 及密度值作图, 可得 3 个峰 (见图 1)。其中峰 I 是极低密度脂蛋白 (VLDL) 峰 II 是 HDL, 峰 III 是其它杂蛋白。然后用琼脂糖电泳进行纯度鉴定。经氨基黑 10B 染色, 显示出只是一条 HDL 带, 证明分离的 HDL 为纯品 (见图 2)。

表1 牛全血清、人混合血清及牛 HDL 脂质含量

血清种类	甘油三酯 (TG)		胆固醇 (ch)		磷脂 (pL)	
	mg%	mmol/L	mg%	mmol/L	mg%	mmol/L
牛全血清	98	1.09	140	3.63	165	53.2
人混合血清	150	1.69	136	3.52	200	64.6
牛 HDL (脱脂前)	59	0.67	102	2.64	138	44.5
牛 HDL (脱脂后)	0	0	0	0	20	5.32

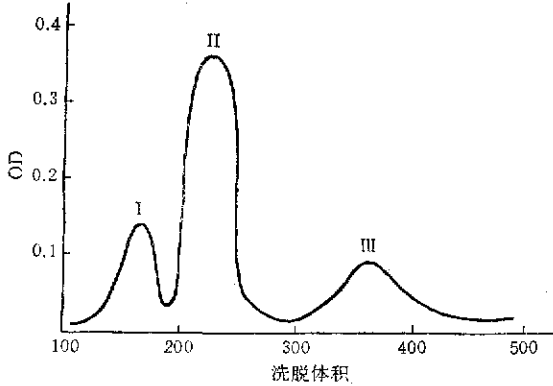


图3 牛 HDL 的 sephadex G-200 凝胶层析洗脱图
峰 I: APOA-I 的聚合物; 峰 II: APOA-I; 峰 III: APOC

(二) 牛 HDL 脱脂及鉴定 本文测定了牛全血清、牛 HDL (脱脂前后) 的脂质含量。并与人的混合血清做了对比 (见表 1)。

从表 1 可以看出脱脂后的 HDL 几乎不含脂质最后用 Coomassie Blue 法测定脱脂后 HDL 的蛋白含量为 1.3mg/1ml, 总体积 20 ml。

(三) 牛 HDL 中 APOA-I 的分离及鉴定 用 0.1mol/L Tris-HCl、6mol/L 脲洗脱液进行 HDL 载脂蛋白的凝胶层析。结果显示 3 个紫外吸收峰。各峰的分离效果很好 (见图 3) 三个组分的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 图谱 (见图 4)。结合国内外的的工作, 可以断定峰 I 为 APOA-I 的聚合物, 峰 II 是 APOA-I, 峰 III 为 APOC。但由于 APOC 含量很低, SDS 电泳中没有显示出来。本文又将牛的 APOA-I 与人、鸭的 APOA-I 的 SDS-PAGE 进行了比较 (见图 5)。免疫双扩散结果 (见图 6)。牛 APOA-I 与兔抗人 APOA-I 血清无免疫沉淀线产生。人 APOA-I 与兔抗人

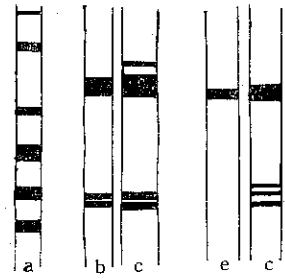


图4 牛 HDL 的 3 个洗脱峰电泳图示意图 a. 标准蛋白; b, c, APOA-I 的聚合物; e. 峰 II; c. 峰 II

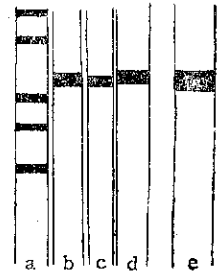


图5 牛、人、鸭 APOA-I 的 SDS-PAGE 比较示意图 a. 标准蛋白; b. 人 APOA-I; c. 鸭 APOA-I; d. 牛 APOA-I; e. 牛 APOA-I

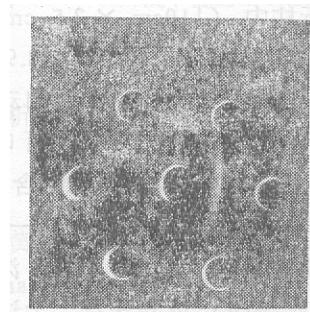


图6 免疫双扩散图谱。中心孔: 兔抗人 APOA-I; 周围孔: 有沉淀线的人 APOA-I, 无沉淀线的为牛 APOA-I

APOA-I 则有明显的沉淀线产生。

(四) 牛 APOA-I 分子量的测定、AA

组成分析及 N 末端测定 电泳结束后测定分离胶长度为 11cm、然后染色,再测量分离胶长为 12cm、指示剂迁移距离为 a、各种蛋白染色带迁移距离为 b,然后得出每条染色带的相对迁移率: $R_f = (11/12 \times b/a)$ 。以 $\log M \cdot W$ (分子量的对数) 为纵坐标, R_f 值为横坐标作一标准曲线(见图 7)。APOA-I 染色带的迁移率(图 7 中)通过测量计算为 $R_f = 0.75$, 相对应得知其分子量的对数为 4.32, 所以分子量为 27040。

表 2 牛、人、鸭 APOA-I 的氨基酸组成

种类 氨基酸	人(%)	鸭(%)	牛(%)	牛(%) d
天冬氨酸	8.89	8.0	8.66	7.0
苏氨酸	4.9	4.28	2.68	2.22
丝氨酸	6.2	3.2	5.49	4.71
谷氨酸	19.2	19.5	20.98	16.50
甘氨酸	4.45	2.28	4.10	4.15
丙氨酸	9.06	9.8	9.82	7.8
缬氨酸	5.87	4.56	5.73	3.9
蛋氨酸	6	1.4	0.45	0.4
异亮氨酸	0	1.64	1.69	1.32
亮氨酸	16.31	2.6	14.36	10.36
酪氨酸	0	2.6	2.55	2.36
苯丙氨酸	3.3	1.32	2.25	2.1
赖氨酸	8.71	8.4	8.65	6.12
组氨酸	1.75	0.4	1.71	1.22
精氨酸	6.94	6.72	6.26	4.5
脯氨酸	4.03	4.68	3.32	2.8
半胱氨酸	0	0	0	0
色氨酸	1.3	1.6	1.28	0.27

注: a、b、c 分别来自文献[5],[2]和[7], d 为本文所获。

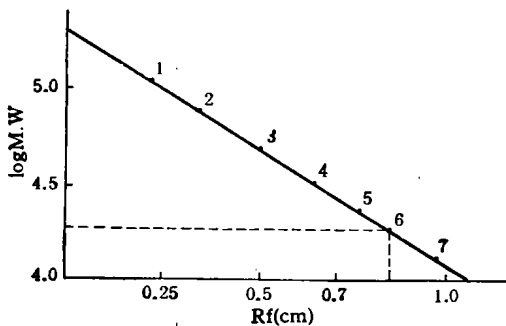


图 7 标准蛋白分子量对数值与 R_f 值关系标准曲线

1. 磷酸酯化酶 b; 2. 白蛋白; 3. 卵清蛋白; 4. 碳酸酐酶;
5. 胰蛋白酶抑制剂; 6. 载脂蛋白-I; 7. α -乳白蛋白

牛 APOA-I 的 AA 组成(见表 2)。表中与人和鸭的 APOA-I 的 AA 组成做了比较。牛的 APOA-I 同人和鸭的一样, 不含半胱氨酸, 极性 AA 含量占 33.6%。用 DABITC 微量法测定 APOA-I 的 N 末端为天冬氨酸。

讨 论

区带头超离心是近 10 年来发展起来的一项新技术。它所需时间短, 分离效果好, 分离样品多, 加样或出样时都在转运中进行。这样减少了停机出样而造成的分界面的搅动。本文利用区带头成功的分离了牛血清脂蛋白, 得到了纯化的 HDL。但缺点是 HDL 被稀释, 仍需浓缩。牛血清及 HDL 的胆固醇和磷脂成分的测定与文献报道相比偏高。这可能与牛的种属及方法不同有关。国内尚未见牛血清磷脂测定的报道, 故无可比较。

脱脂后的牛 HDL 经 sephadex G-200 凝胶过滤得到的 3 个组分中, 组分 II 的分子量为 27040, AA 的组成与 Jonas^[7] 报道的结果也相似。故可断定组分 II 即是牛的 APOA-I。经验表明, APOA-I 的检出量是随豚浓度的增加而增加的, 所以本文选择了用 6mol/L 的豚液处理 HDL, 以使 APOA-I 的抗原决定簇尽量暴露出来。另外从组分 II 占 HDL 总蛋白的百分比中可以知道牛 HDL 中含 APOA-I 为 81—90% 左右, 说明牛 HDL 中富含 APOA-I。

在免疫双扩散中, 可以发现只有人 APOA-I 与兔抗人抗血清产生免疫沉淀线, 而牛、鸭的 APOA-I 与兔抗人 APOA-I 抗血清则没有反应。这与文献^[9]的结果一致。说明牛、鸭的 APOA-I 与人的 APOA-I 抗原决定簇不同, 没有血清学的抗原相关性。这可能与 AA 排列顺序有关。抗原决定簇究竟由哪些 AA 组成, 它们的排列顺序有何不同, 尚需进一步研究。

总之, 本文在国内用区带超离心首次分离了牛的 HDL, 测定了其中脂质含量, 并对其中主要载脂蛋白 APOA-I 进行了分离、提纯及鉴定, 最后又测定了分子量及 AA 组成, 确定了其氨基末端。因而肯定了牛是含 APOA-I 丰

富的动物之一,同时也为提纯、分离 HDL 和 APOA-I 提供了可靠的方法。对于深入研究 HDL 及 APOA-I 的结构功能和代谢、研究动脉硬化发病机理有一定意义。

参 考 文 献

- [1] 王克勤等 1982 人血清极低密度及低密度脂蛋白的大量分离。生物物理与生物化学学报 14(1): 1—7。
- [2] ——1983 鸭血清高密度脂蛋白主要载脂蛋白的分离、提纯及其某些性质的研究。中国医学科学院学报 2: 79—83。
- [3] 李宪周等 1986 鸭高密度脂蛋白载脂蛋白 C-II 的理化性质。中国医学科学院学报 8(5): 12—13。
- [4] 唐京京 1986 首次全国脂蛋白、载脂蛋白学术讨论会论文摘要汇编。24—25 中国医科院基础所。
- [5] 蒋宪成等 1980 人血清载脂蛋白 A-I 的分离纯化及其测定。上海医科大学学报 13(5): 335—338。
- [6] Jonas A. 1972 Physiocochemical properties of bovine serum high density lipoprotein. *J. Biol. Chem.* 247: 7767—7772.
- [7] ————— 1975 Isolation and partial characterization of the major polipoprotein component of bovine serum high density lipoprotein. *Biochim. Biophys. Acta.* 393: 460—470.
- [8] Scamu A. M. et al. 1969 Fractionation of human serum high density lipoprotein in urea solution on evidence for polypeptide heterogeneity. *Biochem.* 8: 3309—3316.
- [9] Swaney B. 1980 Characterization of the high density lipoprotein and its major apoprotein from human canine bovine and chicken plasma. *Biochim. Biophys. Acta.* 617: 489—502.