

人载脂蛋白 H 的分离、纯化和鉴定

王 聪¹ 孙益红^{1Δ} 汪学非¹ 马 端² 李 希³ 汤其群³ 秦新裕¹

(¹复旦大学附属中山医院普外科 上海 200032; ²复旦大学上海医学院分子遗传学研究室 上海 200032;

³复旦大学生物医学研究院 上海 200032)

【摘要】 目的 探索一种相对简便而高效的方法,从人血浆中分离、纯化载脂蛋白 H。**方法** 用高氯酸预处理血浆,以离子交换色谱和亲和色谱相结合的方法进行蛋白质的分离和纯化。用 SDS-聚丙烯酰胺电泳和 Western blot 对纯化产品进行鉴定。用 BCA 蛋白质定量测定试剂盒测定获得载脂蛋白 H 的量。**结果** 连续分离、纯化 3 次,每次获得的产品纯度均大于 98%,且经 Western blot 分析均能与抗 β_2 -Glycoprotein I 单克隆抗体呈阳性反应。3 次纯化共获得 apoH 12.56 mg,平均 21 mg/L。**结论** 本方法重复性好、可靠性高,较传统方法更为简便和经济。

【关键词】 载脂蛋白 H; 分离; 纯化; 鉴定

【中图分类号】 Q 513+.2 **【文献标志码】** A

Separation, purification and identification of human apolipoprotein H

WANG Cong¹, SUN Yi-hong^{1Δ}, WANG Xue-fei¹, MA Duan²,

LI Xi³, TANG Qi-qun³, QIN Xin-yu¹

(¹Department of General Surgery, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China;

²Laboratory of Molecular Genetics, Shanghai Medical School, Fudan University,

Shanghai 200032, China; ³Institutes of Biomedical Sciences,

Fudan University, Shanghai 200032, China)

【Abstract】 Objective To explore a method to separate and purify conveniently and efficiently apolipoprotein H from human plasma. **Methods** We added perchloric acid into human plasma. Apolipoprotein H was separated and purified by ion exchange chromatography and affinity chromatography. The purified apolipoprotein H was analyzed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, Western blot and BCA kit. **Results** We repeated the experiment three times. The purity of the apolipoprotein H was all over 98%. Western blot demonstrated that anti β_2 -Glycoprotein I monoclonal antibody reacted with the purified apolipoprotein H. We obtained a total of 12.56 mg purified apolipoprotein H, average 21 mg/L. **Conclusions** This method has good repeatability, reliability and more convenient and economical than the traditional method.

【Key words】 apolipoprotein H; separate; purify; identify

载脂蛋白 H (apolipoprotein H, apoH) 又称 β_2 -糖蛋白 I (β_2 -Glycoprotein I), 是一个包含了 326 个氨基酸残基高度糖基化的单一多肽链。 β_2 -糖蛋白 I 于 1961 年首先由 Schultze 等分离, 直到 1980 年 Nakaya 等^[1]报道其能体外激活脂蛋白酯酶而被正式命名为载脂蛋白 H。在之后数十年的研究中, apoH 的蛋白质结构、理化特性及基因的多态性已

被陆续阐明; 其参与脂类代谢、凝血等生理功能也已得到证实; 其在自身免疫性疾病、冠状动脉粥样硬化、肾小管损伤、DIC 等疾病中的病理生理作用则受到越来越多学者的关注。2006 年 Luster 等^[2]在研制抗恶性肿瘤的血管靶向剂时发现, apoH 是抗磷脂酰丝氨酸抗体的重要辅助因子 (cofactor), 进一步研究提示该抗体的作用位点是 apoH 的 Domain2。

在构建抗磷脂酰丝氨酸单克隆抗体的研究中,首先需要自人血浆中分离大量高纯度的 apoH,我们探索出了一种相对简便且经济适用的 apoH 分离纯化方法,为 apoH 与临床疾病的相关研究以及新型抗肿瘤血管靶向剂的研制奠定了实验基础。

材 料 和 方 法

材料 人冰冻血浆由复旦大学附属中山医院血库提供。DEAE-Sepharose Fast Flow, SP-Sepharose Fast Flow 购自 GE 公司。Rec-Protein A Sepharose 4B, Rec-Protein G Sepharose 4B 购自 Zymed 公司。透析袋(过滤分子量 10 000)购自上海生工。70%高氯酸购自上海国药集团。小鼠抗人 β_2 -Glycoprotein I 单克隆抗体购自 MILLIPORE 公司。HRP 标记山羊抗小鼠 IgG 抗体购自 Zymed 公司。Western blot 化学发光试剂盒购自 GE 公司。甲叉双丙烯酰胺,考马斯亮蓝 R-250 购自 Fluka 公司。BCA 蛋白质定量测定试剂盒购自申能博彩生物科技有限公司。ImageMasterVDS 成像扫描仪为 Pharmacia 公司产品。Tris 为进口分装,其余试剂均为国产分析纯。纯化的麦芽糖结合蛋白(maltose-binding protein, MBP)由复旦大学分子遗传学研究室惠赠。

血浆预处理 200mL 冰冻血浆 4℃溶解,参考文献^[3,4]方法缓慢加入 70%高氯酸 4.56mL 并搅拌,使高氯酸的终浓度为 1.57%(V/V)。静置 15 min 后 10 000 g 高速离心 45 min。弃去沉淀,上清用饱和碳酸钠调定 pH 至 7.0 后置于工作缓冲液[(Working Buffer, WB), 10mmol/L Tris, 50 mmol/L NaCl, pH 8.0]中透析过夜。

分离与纯化 将 250mL DEAE-Sepharose 色谱柱(3.0 cm×50 cm)与 50mL SP-Sepharose 色谱柱(1.6 cm×25 cm)串联,5 倍柱床体积的 WB 预平衡。经预处理的血浆依次通过 DEAE-Sepharose 色谱柱和 SP-Sepharose 色谱柱。用 250mL WB 冲洗后移去 DEAE-Sepharose 色谱柱,继续冲洗 SP-Sepharose 色谱柱直至基线。在 SP-Sepharose 色谱柱的下游串联已预平衡的 10 mL Protein A Sepharose 色谱柱(1.0 cm×15 cm)和 10mL Protein G Sepharose 色谱柱(1.0 cm×15 cm)。逐渐增加 WB 中的 NaCl 浓度进行阶段洗脱,洗脱液中 NaCl 浓度分别为 200 mmol/L、250 mmol/L、300 mmol/L、350 mmol/L 和 400 mmol/L。收集每个峰的产品超滤浓缩后以 SDS-聚丙烯酰胺电泳(SDS-PAGE)和 Western blot 鉴定。当 NaCl 浓度增加至 350 mmol/L 时获得一个高而宽的洗脱峰(图 1),该

峰的洗脱产品经后续的鉴定证实为 apoH。

上述过程全部在 4℃环境下完成,共重复 3 次,留少量产品用于鉴定外,其余产品经 0.22 μ m 无菌滤器滤过除菌后置于 -80℃保存。色谱柱的工作流量和再生参照产品说明书。

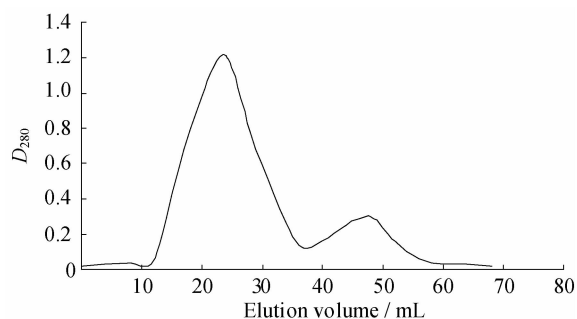


图 1 载脂蛋白 H 的洗脱曲线

Fig 1 Elution diagram of apolipoprotein H

Elution buffer 10 mmol/L Tris, 350 mmol/L NaCl, pH 8.0

蛋白质纯度和相对分子量测定 采用还原性 SDS-聚丙烯酰胺电泳(SDS-PAGE),分离胶和浓缩胶浓度分别为 10%和 5%,上样量 5 μ g/lane。考马斯亮蓝染色,凝胶经 ImageMasterVDS 成像扫描仪扫描后用 Bandscan 软件分析蛋白质纯度。计算标准蛋白质的相对迁移率,和分子量的对数作图,建立标准曲线。从标准曲线上求得 apoH 的相对分子量。

蛋白质浓度测定 按照 BCA 蛋白质定量测定试剂盒说明书进行操作。共测 3 个序列取平均值,在 Excel 中绘制标准曲线,获得函数公式。将产品 5 倍稀释后测 562 nm 的 D 值,带入公式求得蛋白质浓度。

Western blot 测定 将 3 次纯化的产品、预染标准蛋白和阴性对照蛋白(MBP, 相对分子质量 42 500)进行非还原 SDS-PAGE。同时电泳两张凝胶,一张凝胶考马斯亮蓝染色观察条带分布,另一张凝胶于 100 V 恒压电泳转移至 PVDF 膜。PVDF 膜 5%脱脂奶粉 4℃封闭过夜。加入小鼠抗人 β_2 -Glycoprotein I 单克隆抗体(1:2 000 稀释)37℃孵育 2 h, TTBS[Tris-HCl 25 mmol/L (pH 7.5), NaCl 150 mmol/L, Tween20 0.02%]洗膜 3 次,每次 10 min。加入 HRP 标记山羊抗小鼠 IgG 抗体(1:2 000 稀释)37℃孵育 2 h, TTBS 洗膜 3 次后将 PVDF 膜转入按试剂盒说明书配置的显色液中显色。

结 果

蛋白质纯度和相对分子量测定 将纯化产品和

标准蛋白质进行还原性 SDS-PAGE,纯化的 apoH 呈单一条带(图 2),Bandscan 软件分析蛋白质纯度 >98%。计算标准蛋白质的相对迁移率和相对分子质量的对数作图,建立标准曲线(图 3)。从标准曲线上求得 apoH 的相对分子质量为 54 000,符合文献报道^[5]。

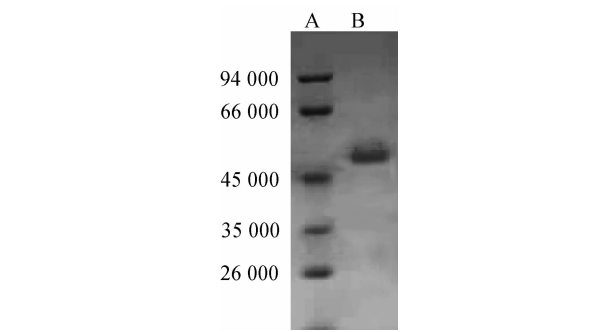


图 2 载脂蛋白 H 的还原性 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定

Fig 2 Reducing SDS-PAGE identification of apolipoprotein H

Lane A:Marker proteins; Lane B:Purified apolipoprotein H

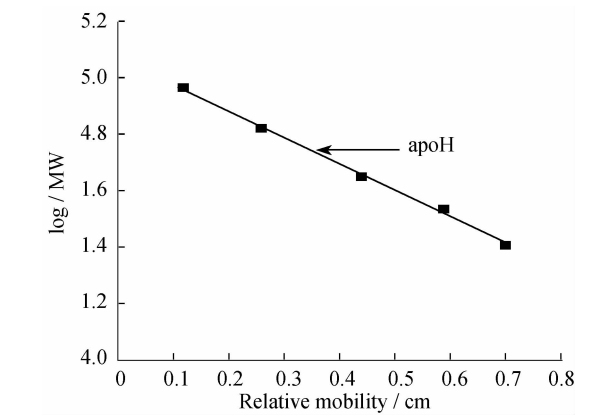


图 3 载脂蛋白 H 的相对分子质量测定

Fig 3 Molecular weight determination of apolipoprotein H

The arrow indicates the relative position of the apolipoprotein H in the gel

蛋白浓度测定 3 次纯化共用去血浆 600 mL, 每次 200 mL。分别获得 apoH 4.43 mg、6.74 mg 和 1.39 mg。具体数据见表 1。

表 1 纯化载脂蛋白 H 的浓度和总量

Tab 1 Concentration and quantity of purified apolipoprotein H

Parameters	Sample 1	Sample 2	Sample 3
Concentration×5(μg/mL)	1 428.7	1 751.1	386.55
Volume(mL)	3.1	3.85	3.6
Quantity(mg)	4.43	6.74	1.39

Western blot 检测 小鼠抗人 β₂-Glycoprotein I 单克隆抗体与 3 次纯化的样品均能结合,与阴性对照蛋白没有结合(图 4)。

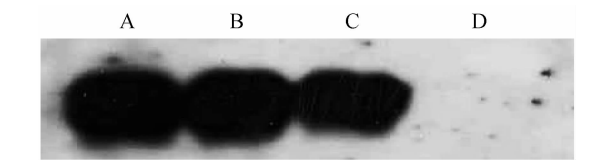


图 4 载脂蛋白 H 的 Western blot 检测结果

Fig 4 Investigation of apolipoprotein H by Western blot

Lane A: Purification apoH for the first time; Lane B: Purification apoH for the second time; Lane C: Purification apoH for the third time; Lane D: MBP(negative control protein)

讨 论

apoH 能与阴性磷脂结合^[6],而在恶性肿瘤特殊的微环境中,新生血管内皮细胞膜上 ATP 依赖的阴性磷脂转移酶失活,原本位于细胞膜内侧的磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PS)暴露于细胞膜外侧。因此针对 PS 的抗体能成为治疗恶性肿瘤的血管靶向剂^[7]。但由于 PS 免疫原性非常弱,以此为抗原来免疫小鼠筛选高效价的抗体非常困难,而 apoH 的某些位点与特异性的抗体结合后形成的二聚体与 PS 有强大的结合能力,因此以 apoH 为抗原,研制 apoH 依赖的抗 PS 单克隆抗体有望成为治疗恶性肿瘤的新型血管靶向剂。为此我们对文献报道分离纯化 apoH 的方法进行了改良,自人血浆中提取了能满足后续实验需求量的高纯度的 apoH。

本文的方法比文献报道的方法更为简便。文献报道的方法^[3,4,8]利用 apoH 能被高氯酸溶解、能与肝素结合的特性,用亲和色谱的方法,将经高氯酸预处理的血浆通过 Heparin-Sepharose 色谱柱来分离 apoH。分离以后再利用离子交换色谱和亲和色谱的方法去除杂蛋白。整个纯化过程需多次洗脱,步骤较为繁琐。本方法将部份纯化工作提前,只需洗脱一次即可获得高纯度的产品,分离和纯化的过程明显缩短。

本文的方法比文献报道的方法成本更低。由于血浆蛋白质背景复杂,Heparin-Sepharose 色谱柱除了吸附 apoH 外,还会吸附血浆中的凝血酶、凝血因子、其他脂蛋白、酯酶、蛋白合成因子、激素等,因此需要的柱床体积较大^[9]。本方法先用 DEAD-Sepharose 色谱柱去除了能结合阳离子的蛋白,因此在分离过程中需要 SP-Sepharose 色谱柱的柱床体积较小,且 SP-Sepharose 色谱柱可以重复使用 1 000 次以上,使用寿命大大长于 Heparin-Sepharose 色谱柱,因此分离、纯化的成本明显缩减。相比购买进口的基因重组 apoH 更具有巨大的成本优势。

本文的方法可重复性和可靠性较为理想。连续分离、纯化 3 次,每次的产品在 SDS-PAGE 上均于同一位置呈单一条带,且经 Western blot 分析均呈阳性反应。

apoH 由于其基因的多态性,在人群中的血浆含量差异很大,为 0~200 mg/L^[10]。亚洲人血浆 apoH 的浓度尚没有文献报道。本文的方法从 600 mL 人血浆中共分离、纯化 apoH 12.56 mg,平均 21 mg/L,能满足各种有关 apoH 的后续科研需要。

参 考 文 献

- [1] Nakaya Y, Schaefer EJ, Brewer HB, *et al.* Activation of human post heparin lipoprotein lipase by apolipoprotein H (beta 2-glycoprotein I)[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1980,95(3):1 168-1 172.
- [2] Luster TA, He J, Huang X, *et al.* Plasma protein beta-2-glycoprotein 1 mediates interaction between the anti-tumor monoclonal antibody 3G4 and anionic phospholipids on endothelial cells[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(40): 29 863-29 871.
- [3] Polz E, Wurm H, Kostner GM, *et al.* Investigations on beta 2-glycoprotein-I in the rat: isolation from serum and demonstration in lipoprotein density fractions [J]. *Int J Biochem*, 1980, 11(3-4):265-270.
- [4] Wurm H. Beta 2-Glycoprotein-I (apolipoprotein H) interactions with phospholipid vesicles[J]. *Int J Biochem*, 1984,16(5):511-515.
- [5] Lozier J, Takahashi N, Putnam FW. Complete amino acid sequence of human plasma beta 2-glycoprotein I [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984,81(12):3 640-3 644.
- [6] Schousboe I, Rasmussen MS. The effect of beta 2-Glycoprotein-I on the dextran sulfate and sulfatide activation of the contact system(Hagemen factor system) in the blood coagulation[J]. *Int J Biochem*, 1988,20(8):787-792.
- [7] Ran S, He J, Huang X, *et al.* Antitumor effects of a monoclonal antibody that binds anionic phospholipids on the surface of tumor blood vessels in mice[J]. *Clin Cancer Res*, 2005,11(4):1 551-1 562.
- [8] Schousboe I. Purification, characterization and identification of an agglutinin in human serum[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1979,579(2):396-408.
- [9] Shelburne FA, Quarfordt SH. The interaction of heparin with an apoprotein of human very low density lipoprotein[J]. *J Clin Invest*, 1977,60(5):944-950.
- [10] Ephraïm B, Kamboh MI, Adams-Campbell LL, *et al.* Genetic studies of human apolipoproteins: Role of the apolipoprotein H polymorphism in relation to serum lipoprotein concentrations[J]. *Hum Genet*, 1989,82(2):118-122.

(收稿日期:2008-06-13;编辑:王蔚)