DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.01.020

Biosen&bioelectro, 1998, 13: 629—634.
[3] Fodor S P. Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis [J]. Science, 1991, 251(Feb): 767—773.
[4] 金冬雁, 黎孟枫, 等 译. 分子克隆实验指南[M]. 第2版. 北京: 科学出版社出版, 1992. 858.
[5] Lueking A, Horn M, Eickhoff H, *et al*. Protein Microarrays for gene expressionand antibody screening[J]. Analytical Biochemistry, 1999, 270: 103—111.

(编辑 陈聪连)

个案与短篇

文章编号: 1000-5404(2002)01-0046-01

一次性密度梯度超速离心分离人血清脂蛋白及无脂血清

Separation of human serum liproproteins and lipoprotein-deficint serum by one-step density gradient ultracentrifugation

何菊英, 刘松青 (第三军医大学附属西南医院药剂科, 重庆 400038)

本研究采用角度转头和一次性密度梯度超速离心法, 从正常人血清中将 VLDL, LDL, HDL 和无脂血清相互分离, 效果满意, 并成功应用于脂蛋白和胆固醇代谢的研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 仪器 超速离心机为 BeckmanL8-55 型, 55.2-Ti 角度转头, 容量 38.5×10 ml。分析天平为 TG-328 型(浙江温州天平仪器厂)。

1.1.2 密度盐溶液配制 将分析纯之 NaCl、KBr 在 125 ℃干燥 24 h 后, 将 NaCl 配制成密度为 1.006 的溶液, 而干燥 KBr 用于调定血清密度。

1.1.3 人血清标本 正常人新鲜全血, 在室温放置 1h 使凝固, 然后在 4 ℃、5 000 r/min 离心 30 min, 取出血清, 加 NaN_3(终浓度为 0.01%)。

1.1.4 试剂 氨基黑 10 B、苏丹黑 10 B 均为北京化工厂产品, 其余试剂均系分析纯。

1.2 方法

1.2.1 人血清脂蛋白的快速分离 取正常人混合血清, 定量移入烧杯中, 根据 d= m/v, 用万分之一分析天平根据称量法测出血清初始密度 do, 用干燥固体溴化钾调血清密度至 1 300 g/ml, 按 Radding-Steining 公式计算需加入的干燥 KBr 重量, 公式如下: X= Vo(dm-do)/1-0.312× d m 式中, Vo 代表原血清毫升数, do 代表初始血清密度, dm 代表需调定的血清密度, 0.312 为 KBr 的比容(ml/g), X 代表需加 KBr 克数。

待固体溴化钾完全溶解后, 将血清分别移至 10 个透明的离心管中, 再用滴管沿管壁小心铺加密度为 1.006 的氯化钠溶液约 28 ml, 勿使界面混扰。平衡后加盖封闭, 小心放入 55.2-Ti 角度转头, 置入 Beckman L8-55 型超速离心机中, 选用慢加速工作程序, 加速和减速时间均控制在 45 min, 10 ℃, 50 000 r/min, 离心 5 h。离心结束后, 取出离心管, 见血清脂蛋白已分层。

1.2.2 透析 将超速离心所得四个组分分别置于透析带中, 反复透析 48 h(4 ℃), 每日换透析液 3~4 次, 透析液为 0.15 mol/L NaCl 和 0.3 mmol/L EDTA 的缓冲液(pH 7.4)。

1.2.3 聚丙烯酰胺凝胶电泳[1] 将超速离心分离各组分进行电泳, 凝胶浓度为 3.85%, 脂蛋白用苏丹黑 10B 预染, 电泳后再以氨基黑 10 B 染蛋白质。

作者简介: 何菊英(1970—), 女, 四川省内江市人, 主管药师, 主要从事临床药理方面的研究。电话: (023)68754225
收稿日期: 2001-04-05; 修回日期: 2001-10-14

2 结果

2.1 超速离心对血清脂蛋白分离的效果

按方法 1 进行, 离心结束后可见离心管中液体明显分为七层: 顶部乳白色为极低密度脂蛋白, 第三层淡黄色为低密度脂蛋白, 第五层橘黄色为高密度脂蛋白, 第二、四、六层为生理盐水, 最低层为脱脂血清。并将各层脂蛋白及无脂血清用吸管收集于系列试管中。

2.2 各种脂蛋白纯度的鉴定[2]

聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE): 分离的人血清脂蛋白与正常人血清同时进行电泳, 用苏丹黑 10 B 预染脂质, 经不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳后, 凝胶柱上正常人血清脂蛋白分成三个区带, 从上到下依次为 VLDL、LDL 及 HDL, 而分离的脂蛋白均为单一区带, 并与正常人血清三种脂蛋白的泳动位置相对应, 表明没有脂蛋白间的相互混杂, 为电泳纯的单一脂蛋白组分。无脂血清脂染色阴性。

3 讨论

分离血清脂蛋白, 国外学者多采用系列超速离心法, 但离心时间很长(90 h 左右), 且需 Abbe 折射仪调血清密度。本研究在无 Abbe 折射仪调血清密度条件下, 采用称量法以及角度转头和一次性密度梯度超速离心, 将离心时间缩短到 5 h, 并且分离效果满意, 重复性好, 为一次性获得相当量的人血清脂蛋白及 LDS 提供了一种简便可行的手段。本法中获得的脱脂血清平均胆固醇含量仅为 0.046 mmol/L、甘油三酯为 0.2 mmol/L, 而且该脱脂血清可用于细胞脂蛋白受体功能测定及体外细胞胆固醇代谢的研究。本研究成功地应用了一次性密度梯度超速离心法制备了所需各种脂蛋白及脱脂血清, 为进一步研究动脉粥样硬化发生原理及某些降血脂药作用机制提供了有利条件。

关键词: 极低密度脂蛋白(VLDL); 低密度脂蛋白(LDL); 高密度脂蛋白(HDL); 脱脂血清(LDS); 密度梯度
中图法分类号: R446.1 文献标识码: B

参考文献:

[1] 赵凤丽, 王拥军, 周卫东, 等. 低密度脂蛋白颗粒大小测定及意义[J]. 临床检验杂志, 2000, 18(2): 73—75.
[2] 楼正青, 庄一义. 人工合成高密度脂蛋白样颗粒测定血清胆固醇酯转运蛋白活性[J]. 临床检验杂志, 2001, 19(2): 88—90.

(编辑 汪勤俭)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net