



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109323910 B

(45) 授权公告日 2021.01.08

(21) 申请号 201811472111.7

G01N 33/68 (2006.01)

(22) 申请日 2018.12.03

(56) 对比文件

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 109323910 A

christopher M.west et al.A Physical Explanation for Multiple-Cell Classes after Centrifugation in Colloidal Silica Gradients.《analytical biochemistry》.1976, 689-605.

(43) 申请公布日 2019.02.12

(73) 专利权人 徐州市中心医院
地址 221009 江苏省徐州市泉山区解放路
199号

审查员 牛牧川

专利权人 庞慧

(72) 发明人 庞慧

(74) 专利代理机构 徐州市三联专利事务所
32220

代理人 何君

(51) Int.Cl.

G01N 1/34 (2006.01)

权利要求书1页 说明书6页 附图1页

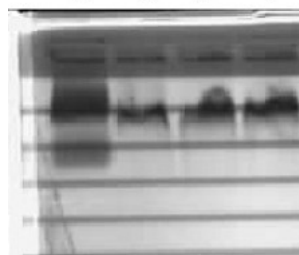
(54) 发明名称

一种高纯度低密度脂蛋白的制备方法

(57) 摘要

本发明属于物质提取技术领域,具体涉及一种高纯度低密度脂蛋白的制备方法,根据密度不同离心去除血浆中的乳糜微粒、极低密度脂蛋白,提取剩余的血浆加入溴化钾调密度为1.045g/mL,再进行离心得到位于最上层的常规低密度脂蛋白,使用磷酸缓冲盐溶液透析降低K⁺浓度,低密度脂蛋白透析前后K⁺浓度的全自动生化分析仪所测结果与渗透压仪检测结果相比较,如透析至与磷酸缓冲盐溶液渗透压无明显差异,则认为溴化钾被完全透析,进而获取高纯度低密度脂蛋白。上述方法可以获取高纯度的低密度脂蛋白满足现有的实验要求。

1 2 3 4



1. 一种高纯度低密度脂蛋白的制备方法,其特征在于,采用超速离心机固定角式转头密度梯度离心法,通过溴化钾调整血浆密度,实现各类脂蛋白的逐层分离,利用琼脂糖凝胶电泳鉴定血浆低密度脂蛋白纯度,全自动生化分析仪测定低密度脂蛋白及 K^+ 浓度,渗透压仪检测透析前后低密度脂蛋白的渗透压,具体包括以下步骤:

根据密度不同离心去除血浆中的乳糜微粒、极低密度脂蛋白,提取剩余的血浆加入溴化钾调密度为 1.045g/mL ,再进行离心得到位于最上层的常规低密度脂蛋白,使用磷酸缓冲盐溶液透析降低 K^+ 浓度,低密度脂蛋白透析前后 K^+ 浓度的全自动生化分析仪所测结果与渗透压仪检测结果相比较,如透析至与磷酸缓冲盐溶液渗透压无明显差异,则认为溴化钾被完全透析,进而获取高纯度低密度脂蛋白;将上述步骤中离心得到位于最上层的常规低密度脂蛋白吸取后,提取第二层并加入溴化钾调密度为 1.045g/mL ,再次离心得到高浓度低密度脂蛋白。

一种高纯度低密度脂蛋白的制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于物质提取技术领域,具体涉及一种高纯度低密度脂蛋白的制备方法。

背景技术

[0002] 血脂是血清中胆固醇、甘油三酯和类脂等的总称,血脂不溶于水,必须与载脂蛋白结合形成脂蛋白才能溶于血液,被运输至组织进行代谢。低密度脂蛋白胆固醇(Low-density Lipoprotein Cholesterol,LDL-C)是血液中胆固醇含量(约50%)最多的脂蛋白,故LDL-C浓度基本能反应血液低密度脂蛋白(LDL)总量。另外,LDL能够被氧化为氧化型LDL(Oxidized Low-density Lipoprotein, Ox-LDL)。

[0003] 用于脂蛋白分析的三种常见超速离心法是:分析性超速离心、区带超速离心、制备性超速离心,在超速离心过程中各类脂蛋白因其密度不同而上浮速度各异,各类脂蛋白可通过依次增加血浆密度而分离。目前市场上用于科研的LDL主要分为冻干粉及液体两种保存形式。如实验需要高浓度LDL进行干预,冻干粉往往不能够被溶剂完全溶解,且冻干粉本身就on易造成LDL生物活性减低,而液体LDL的浓缩主要采用风干的方法,也容易影响其生物活性。LDL提取过程中加入大量溴化钾(KBr)调密度,需要透析后才能用于后续实验,但是LDL透析的时间各不相同,尚无统一标准。这与透析时LDL的体积与磷酸缓冲盐溶液(PBS)的体积比,换液时间间隔及次数,透析袋宽度等多个因素有关。并且很多实验室透析袋都是经过洗净、灭菌等步骤后回收利用的,这样对透析袋反复多次处理,会明显影响透析的效率。血浆LDL的常规提取量一般较少,如实验需大量LDL时,单个体单次采血量难以满足要求。但单个体多次采血、多个体单次采血或者多个体多次采血均不能保证LDL活性的批间差异,更无法保证实验结果的稳定性及可重复性。

发明内容

[0004] 为了克服上述现有技术的不足之处,本发明提供一种高纯度低密度脂蛋白的制备方法。

[0005] 本发明是通过如下技术方案实现的:一种高纯度低密度脂蛋白的制备方法,采用超速离心机固定角式转头密度梯度离心法,通过溴化钾调整血浆密度,实现各类脂蛋白的逐层分离,利用琼脂糖凝胶电泳鉴定血浆低密度脂蛋白纯度,全自动生化分析仪测定低密度脂蛋白及 K^+ 浓度,渗透压仪检测透析前后低密度脂蛋白的渗透压,具体包括以下步骤:

[0006] 根据密度不同离心去除血浆中的乳糜微粒、极低密度脂蛋白,提取剩余的血浆加入溴化钾调密度为1.045g/mL,再进行离心得到位于最上层的常规低密度脂蛋白,使用磷酸缓冲盐溶液透析降低 K^+ 浓度,低密度脂蛋白透析前后 K^+ 浓度的全自动生化分析仪所测结果与渗透压仪检测结果相比较,如透析至与磷酸缓冲盐溶液渗透压无明显差异,则认为溴化钾被完全透析,进而获取高纯度低密度脂蛋白。

[0007] 进一步地,将上述步骤中离心得到位于最上层的常规低密度脂蛋白吸取后,提取第二层并加入溴化钾调密度为1.045g/mL,再次离心得到高浓度低密度脂蛋白。

[0008] 进一步地,将上述步骤中离心得到位于最上层的常规低密度脂蛋白吸取后,提取第二层和第三层,并混合后加入超纯水调密度为1.045g/mL,再次离心获得纯度较高的低密度脂蛋白。

[0009] 本发明采用固定角式转头密度梯度离心法,加入KBr调整血浆的密度,实现各类脂蛋白的逐层分离。再利用渗透压仪、全自动生化分析仪、琼脂糖凝胶电泳纯化及鉴定血浆LDL。提取的LDL透析至与PBS缓冲液渗透压无明显差异时,可以认为KBr已被完全去除;将第一次离心去除LDL的第二层调密度后,再次离心得高浓度LDL;混合第二、三两层或仅第二层调密度后,仍可离心得到高纯度LDL,提高了回收率。

[0010] 具体的操作方法如下:

[0011] 1、制备高纯度LDL的方法

[0012] 取血浆(含1mmol/L乙二胺四乙酸)离心,4℃,20000rpm×2h除去CM,将其余部分混合后加入KBr调密度为1.025g/mL离心,4℃,50000rpm×12h除去VLDL,收集剩下的血浆加入KBr调密度为1.045g/mL离心,4℃,50000rpm×12h得最上层的常规LDL。由于LDL提取过程中加入大量KBr,致使透析前K⁺浓度较正常高出数十倍,通过PBS缓冲液的反复多次透析后,K⁺浓度明显降低,对于如心肌细胞收缩功能测定、膜片钳钾通道的测定等无明显影响。将LDL透析前后K⁺浓度的全自动生化分析仪所测结果,与对应渗透压相比较发现,如透析至与PBS缓冲液渗透压无明显差异,则可以认为KBr被完全透析。

[0013] 2、制备高浓度LDL的方法

[0014] 取血浆(含1mmol/L乙二胺四乙酸)离心,4℃,20000rpm×2h除去CM,将其余部分混合后加入KBr调密度为1.025g/mL离心,4℃,50000rpm×12h除去VLDL,收集剩下的血浆加入KBr调密度为1.045g/mL离心,4℃,50000rpm×12h得最上层的常规LDL,将其中的第二层吸出混合加入KBr调密度为1.045g/mL离心,4℃,50000rpm×12h,吸出淡黄色的上层液体,即为高浓度的LDL。对于部分需要高浓度LDL的实验,基本上无需浓缩即可使用。

[0015] 3、提高LDL回收率的方法

[0016] 取血浆(含1mmol/L乙二胺四乙酸)离心,4℃,20000rpm×2h除去CM,将其余部分混合后加入KBr调密度为1.025g/mL离心,4℃,50000rpm×12h除去VLDL,收集剩下的血浆加入KBr调密度为1.045g/mL离心,4℃,50000rpm×12h得最上层的常规LDL。实验中除第一次加入KBr调密度为1.045g/mL所得常规LDL外,无论混合第二、三两层加入超纯水或仅第二层加入KBr调密度为1.045g/mL,亦可再次获得纯度较高的LDL,只是浓度有所差别。反复多次从血浆中提取LDL,可以明显提高其回收率。

[0017] 本发明的方法在五个方面做了优化与改良:

[0018] 一、目前市场上用于科研的LDL主要分为冻干粉及液体两种保存形式。如实验需要高浓度LDL进行干预,冻干粉往往不能够被溶剂完全溶解,且冻干粉本身就容易造成LDL生物活性减低,而液体LDL的浓缩主要采用风干的方法,也容易影响其生物活性。本发明首先离心去除CM与VLDL,收集剩下的血浆调密度为1.045g/mL,离心得最上层的LDL,将其中的第二层吸出混合调密度为1.045g/mL,离心后吸出淡黄色的上层液体,即为高浓度的LDL。对于部分需要高浓度LDL的实验,基本上无需浓缩即可使用。

[0019] 二、本发明采用全自动生化分析仪检测LDL的含量标定提取LDL的浓度。现今国际上通常采用BCA试剂盒或Lowry法测定LDL的蛋白含量,以蛋白量的大小来反应LDL中相应脂

质量的大小。LDL主要是载脂蛋白ApoB和胆固醇酯组成的，而脂蛋白中胆固醇酯含量较为稳定，细胞吞噬大量脂质才会泡沫化，因此虽然测脂质不如测蛋白方便，但是测定LDL中胆固醇的方法作为脂蛋白的定量依据更为科学、严谨。

[0020] 三、本发明将提取出的LDL溶液置入再生纤维素透析袋内，然后浸入PBS缓冲液中，通过PBS缓冲液的反复多次透析后，样品溶液中的大分子量的生物大分子被截留在袋内，而盐和小分子物质不断扩散透析到袋外，通过不断更换缓冲液，即可将样品中要除掉的小分子稀释到足够低的浓度。对于影响透析的多个因素本发明没有具体限定，而是就其透析完全的指标加以分析。最终通过全自动生化分析仪与渗透压仪确定透析的程度，以及是否达到后续实验的要求。正常血浆中 K^+ 浓度为 $3.5-5.5\text{mmol/L}$ ，由于LDL提取过程中加入大量KBr，致使透析前 K^+ 浓度较正常高出数十倍。正常情况下细胞内的 K^+ 比细胞外高几十倍，当LDL中的大量KBr没有被完全透析而作为干预因素作用于细胞时，导致细胞内外 K^+ 浓度差变小，对心肌、骨骼肌、酸碱平衡等都会产生影响，如引起心肌兴奋性先升高后降低，传导性降低，自律性降低，收缩性减弱等。通过PBS缓冲液的反复多次透析后， K^+ 浓度明显降低，对于如心肌细胞收缩功能测定、膜片钳钾通道的测定等才能不产生明显影响。

[0021] 四、本发明将LDL透析前后 K^+ 浓度的全自动生化分析仪所测结果，与渗透压仪检测结果相比较发现，如透析至与PBS缓冲液渗透压无明显差异，则可以认为KBr被完全透析，LDL可以作为一种干预因素用于后续实验。与渗透压仪相比，全自动生化分析仪的检测成本高，耗时长，需要的样本量大。以PBS缓冲液渗透压为参照，采用渗透压仪测定LDL透析液的渗透压值就能便捷的反映LDL纯度。

[0022] 五、本发明中除第一次加入KBr调密度为 1.045g/mL 所得LDL外，混合第二、三两层加入超纯水或仅第二层再次加入KBr调密度为 1.045g/mL 离心后，亦可再次获得纯度较高的LDL。序贯漂浮超速离心法虽然能够处理较大的血浆样本量，但是耗时很长。常规的密度梯度超速离心法主要优点就是大大缩短离心时间，但是它所能处理的血浆样本量较序贯漂浮超速离心法少得多，无法一次性制备大量脂蛋白样本，故脂蛋白的回收率较低。本发明采用超速离心机固定角式转头密度梯度离心法，反复多次从血浆中提取LDL，可以明显提高其回收率，为分离制备大量实验所用的脂蛋白样本成功地探索出一条新的途径。

[0023] 本发明的有益效果是：1、LDL纯度高：通过PBS缓冲液的反复多次透析后，以PBS缓冲液渗透压为参照，采用渗透压仪测定LDL透析液的渗透压值可以便捷的反映LDL纯度。

[0024] 2、LDL浓度高：将常规超速离心第一次所得LDL吸出后，第二层再次加入KBr调整密度后提取的LDL浓度显著高于之前第一次提取的LDL。

[0025] 3、LDL回收率高：除常规超速离心第一次所得LDL，混合第二、三两层再次加入超纯水调密度后仍能离心得到高纯度的LDL。反复多次从血浆中提取LDL，可以明显提高LDL回收率。

附图说明

[0026] 图1 LDL苏丹黑B染色琼脂糖电泳图[1为正常血浆，2、3、4分别为C组、A组、B组提取的LDL]

[0027] 图2 LDL及Ox-LDL苏丹黑B染色琼脂糖电泳图[1为正常血浆，2为B组提取的LDL，3、4、5分别为A组、B组、C组提取LDL氧化后的Ox-LDL]

具体实施方式

[0028] 下面根据附图和实施例对本发明进一步说明。

[0029] 1、血浆分离：

[0030] 在血浆中加入乙二胺四乙酸(EDTA)，终浓度为1mmol/L，3000rpm×20min，沉淀为血细胞，上清血浆待用。

[0031] 2、CM分离：

[0032] 离心机：Beckman Avanti J-E高速冷冻离心机；

[0033] 转头，离心管：JA-20：20000rpm，18400×g，8×50ml；

[0034] 离心参数：4℃，20000rpm×2h；

[0035] 离心结果：CM呈白色上浮于液体的表面，或紧贴于离心管壁，小心吸出。

[0036] 3、血浆脂蛋白的分离：

[0037] 离心机：Hitachi CP-80WX超速离心机；

[0038] 转头，离心管：P70AT：70000rpm，505000×g，8×40ml，40PA管。

[0039] 3.1、VLDL分离：

[0040] 血浆处理：将去除CM后的血浆混合，加入超纯水或KBr，调密度至1.025g/mL；

[0041] 离心参数：4℃，50000rpm×12h；

[0042] 离心结果：VLDL浮于离心管的上层呈奶油状，约占上面无色透明层的1/2，用巴氏吸管仔细吸出。若血浆含有大量甘油三脂(>1000mg/ml)，VLDL则在管顶部形成淡黄色透明的胶状层。

[0043] 3.2、LDL分离：

[0044] 血浆处理：将去除VLDL后的血浆混合，加入KBr，使最终密度为1.045g/mL；

[0045] 离心参数：4℃，50000rpm×12h；

[0046] 离心结果：大致可以分为三层：LDL形成一层淡黄色带浮于顶部为最上层(A组)，用巴氏吸管仔细吸出。第二层与第三层之间存在一条白色颗粒漂浮带。将上步离心吸出LDL后的剩余液体，分为两种不同方法处理：

[0047] (1) 将第二层的液体吸出混合后，加入KBr，调密度至1.045g/mL。

[0048] 离心参数：4℃，50000rpm×12h；

[0049] 离心结果：大致分为两层：LDL浮于最上层为淡黄色(B组)，用巴氏吸管仔细吸出。第二层液体的黄色较LDL层稍深。

[0050] (2) 将第二、三层的液体混合后，加超纯水，调密度至1.045g/mL。

[0051] 离心参数：4℃，50000rpm×12h；

[0052] 离心结果：大致可以分为三层：LDL浮于最上层为无色透明(C组)，用巴氏吸管仔细吸出。第二层与第三层之间仍存在一条白色颗粒漂浮带。

[0053] 4、将上述所得LDL移入再生纤维素透析袋，两端用透析袋夹夹紧，放入0.01mol/L的PBS缓冲液(NaCl 138mM，KCl 2.7mM，Na₂HPO₄ 10.14mM，KH₂PO₄ 1.76mM，PH=7.4)中4℃透析5-8h，以除去离心过程中所加的抗氧化剂和大量的KBr。

[0054] 5、经过上述处理后，根据是否进行后续氧化，可以对LDL做以下两种不同处理：

[0055] 5.1、如不需氧化，将LDL以0.22μm滤膜过滤除菌后，保存于Tris缓冲液(Tris-HCl 50mM，NaCl 0.15M，EDTA2mM，PH=7.4)，4℃备用。

[0056] 5.2、如需氧化,用PBS缓冲液将LDL稀释至蛋白浓度0.5mg/ml,加入终浓度为5 μ mol/L的新鲜配制的CuSO₄溶液,37 $^{\circ}$ C孵育24小时后,放入0.01mol/L的PBS中4 $^{\circ}$ C透析5-8h,以终止氧化反应。氧化前的LDL为淡黄色,氧化后一般黄色消失甚至出现乳白色,这是肉眼判断氧化成功的标准。将制备好的Ox-LDL以0.22 μ m滤膜过滤除菌后,保存于Tris缓冲液,4 $^{\circ}$ C备用。

[0057] 6、实验中测定LDL浓度(全自动生化分析仪)、渗透压(渗透压仪WESCOR5520,美国)及Ox-LDL氧化修饰程度(琼脂糖凝胶电泳以及MDA试剂盒,南京建成生物公司)。

[0058] 7、统计学方法:

[0059] 采用SPSS23.0统计分析软件进行统计学分析,定量资料以均数 \pm 标准差(mean \pm SD)表示,三组样本均数间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

[0060] 8、结果:

[0061] 8.1、琼脂糖凝胶电泳结果:

[0062] 三组不同方法提取的LDL经苏丹黑B染色后,均呈单条色带,证明三组不同方法提取的LDL纯度均较高(图1)。琼脂糖电泳时,ApoB中的赖氨酸残基与醛反应使Ox-LDL相对带负电荷,其向阳极迁移,根据Ox-LDL电泳距离和非氧化LDL的电泳距离之比的变化即相对电泳迁移率,判断其氧化修饰的程度。三组不同方法提取的LDL经氧化后,Ox-LDL的相对电泳迁移率均加快,但是三组之间无明显差异(图2)。

[0063] 8.2、硫代巴比妥酸反应物(TBARS)测定:

[0064] 脂质过氧化物(LPO)的分解产物丙二醛(MDA),在酸性环境下能与硫代巴比妥酸(TBA)形成红色物质,可在532nm比色测定。测MDA的含量与Ox-LDL浓度之间没有关系,它主要说明LDL已经氧化以及氧化的程度,它的值不能代表Ox-LDL的含量。我们实验中Ox-LDL是LDL TBARS值的5-8倍,结合Ox-LDL相对电泳迁移率的增加,说明LDL已经被氧化。

[0065] 8.3、提取LDL浓度的全自动生化分析仪检测(表1):

[0066] 第一次调密度为1.045g/mL,离心后大致分为三层,通过琼脂糖凝胶电泳的结果,发现第一层为较纯的LDL,第二层以LDL为主及少量HDL,第三层以HDL为主及少量LDL,根据此线索又对上述样品进行了全自动生化分析仪的检测,结论与前面一致。按照方案中三种不同提取方法得到的LDL,分别进行全自动生化分析仪检测,结果发现三组之间LDL浓度有显著差异($P < 0.05$),B组 $>$ A组 $>$ C组($P < 0.05$)。

[0067] 表1 LDL检测结果(mean \pm SD,n=6)

分组	LDL (mmol/L)
A 组	1.62 \pm 0.40
B 组	4.58 \pm 0.71
C 组	0.22 \pm 0.05

[0069] 8.4、提取LDL透析前后渗透压的改变(表2):

[0070] LDL透析后渗透压较透析前明显降低($P < 0.05$),但是和PBS缓冲液相比无明显差异。与透析前及PBS缓冲液相比较,LDL透析后的K⁺浓度均明显减少($P < 0.05$)。将LDL中含K⁺浓度的全自动生化分析仪所测结果,与对应渗透压相比较发现,如透析至与PBS缓冲液渗透

压无明显差异,则可以认为KBr被完全透析,LDL可以作为一种干预因素用于后续实验。

[0071] 表2 LDL透析前后渗透压与K⁺浓度的改变 (mean±SD,n=6)

	分组	渗透压 (mmol/kg)	K ⁺ (mmol/L)
[0072]	1mM LDL 透析前	437.25 ± 7.32	14.78 ± 3.05
	1mM LDL 透析后	304.75 ± 2.75	0.52 ± 0.11
	0.01M PBS 缓冲液	298.40 ± 1.82	4.46 ± 0.06

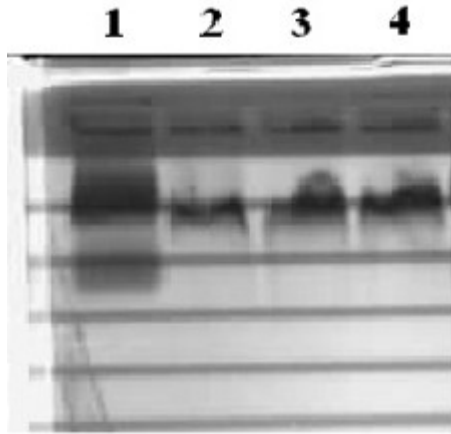


图1

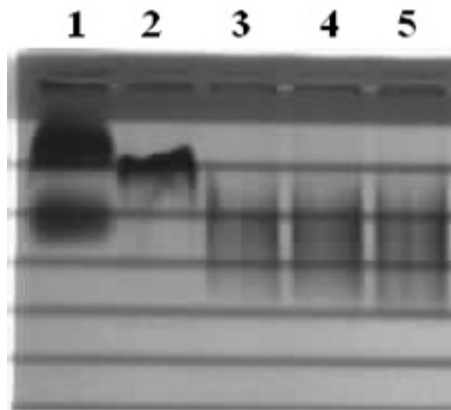


图2