

ПРОТОКОЛ ПРЕПАРАТИВНОГО ВЫДЕЛЕНИЯ ФРАКЦИЙ ЛНП И ЛВП ИЗ ПЛАЗМЫ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Л.А. Калужский, Е.О. Яблоков, И.Ю. Торопыгин, М.А. Константинов, О.В. Гнеденко, Ю.В. Мезенцев, А.С. Иванов, А.И. Арчаков*

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича,
119121, Москва, Погодинская ул., 10; *e-mail: gnedenko.oksana@gmail.com

В патогенезе атеросклероза, основной причины сердечно-сосудистых заболеваний, включая ишемическую болезнь сердца и инсульт, участвуют липопротеины плазмы крови, которые различаются по составу белков и липидов, размеру, заряду и функциям. В настоящее время для выделения липопротеинов широко применяются хроматографические методы, в частности гель-фильтрация (SEC). В данной статье мы приводим протокол препаративного выделения фракций липопротеинов низкой плотности (ЛНП) и липопротеинов высокой плотности (ЛВП) из плазмы крови человека с помощью гель-хроматографии. Для определения границ зон элюции аполипопротеинов А-1 и В-100, маркеров ЛВП и ЛНП, соответственно, мы использовали жидкостную хроматографию с тандемной масс-спектрометрией (LC-MS/MS) с кросс-валидацией методом иммуноферментного анализа (ИФА). Полученные с помощью SEC фракции липопротеинов могут быть использованы для различных исследований, имеющих научно-прикладное значение.

Ключевые слова: липопротеины плазмы крови; ЛОНП, ЛНП, ЛВП; высокоэффективная гель-хроматография; масс-спектрометрическая идентификация апобелков

DOI: 10.18097/BMCRM00327

ВВЕДЕНИЕ

Атеросклероз является основной причиной сердечно-сосудистых заболеваний, включая ишемическую болезнь сердца и инсульт, и сопровождается сужением просвета артерий из-за формирования атеросклеротических бляшек [1]. В его патогенезе участвуют липопротеины плазмы крови, которые различаются по составу белков и липидов, размеру, заряду и функциям, и по плотности делятся на липопротеины очень низкой плотности (ЛОНП), ЛНП и ЛВП [2]. Для липопротеинов разных классов, характерны маркерные апобелки, позволяющие идентифицировать соответствующую фракцию липопротеинов различными методами, таких как ИФА [3], вестерн-блотт [4] и масс-спектрометрия [4, 5].

Существует ряд методов, позволяющих выделить аполипопротеины из биологических образцов для их дальнейшего изучения. В настоящее время для выделения липопротеинов активно используются методы хроматографии: ионообменная хроматография [6, 7], афинная хроматография [8-10], а также гель-фильтрация (SEC) [3, 5]. SEC является одним из наиболее доступных и простых методов разделения сложных смесей с сохранением нативности компонентов [11]. Широко применяется сочетание SEC и масс-спектрометрической идентификации апобелков с ортогональными методиками (ИФА, вестерн-блот, иммунотурбидиметрия и т.д.) для валидации результатов масс-спектрометрии [3-5].

В данной статье мы приводим протокол препаративного выделения фракций ЛНП и ЛВП из плазмы крови человека с помощью SEC. Для определения границ зон элюции целевых аполипопротеинов мы использовали LC-MS/MS с

кросс-валидацией ИФА. Полученные таким образом фракции липопротеинов могут быть использованы для различных исследований, имеющих научно-прикладное значение.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реактивы

Концентрат PBS (0.1 М фосфатный буфер, 27 мМ KCl, 1.37 М NaCl) был получен от «Cytiva» (США). Трис-(2-карбокsetил)-фосфин (ТСЕР) был получен от «Thermo Scientific» (США), 2-хлорацетамид (САА) и аммоний бикарбонатный буфер (рН 7.8) были получены от «Sigma» (США), муравьиная кислота от «Merck Millipore» (США), вода LC-MS grade («neoFroxx GmbH», Германия), ацетонитрил LC-MS grade («Biosolve Chimie», Франция). Для определения концентраций аполипопротеинов А-1 и В-100 использовали наборы ELISA Kit for Apolipoprotein A1 и ELISA Kit for Apolipoprotein B100 («Cloud-Clone», КНР), соответственно.

Остальные реактивы были получены от отечественных производителей.

Плазма крови человека

Кровь с антикоагулянтом (К-ЭДТА) была получена от здорового донора (поставщик «АБМ», Россия). Кровь с антикоагулянтом (К-ЭДТА) центрифугировали при 1500 g в течение 15 мин на центрифуге Heraeus Varifuge 3.0 RS («Heraeus», Германия). Плазму крови человека аликвотили по 500 мкл и хранили при -40°C.



Высокоэффективная гель-хроматография

Разделение фракций плазмы крови проводили на хроматографе АКТА Purifier 10 («GE Healthcare Life Sciences», США) с готовой к использованию калиброванной производителем колонкой 10/300GL, заполненной гелем Superose 6 («Cytiva», США). PBS (pH 7.4) готовили путем разведения дистиллированной водой в 10 раз концентрата и добавления 0.5% NaN₃. Образец плазмы крови человека инжестировали в объеме 100 мкл. Хроматографическая система работала с постоянным потоком 0.3 мл/мин на всём протяжении эксперимента. Во время процесса разделения поддерживали постоянную температуру хроматографической камеры 4°C, элюцию контролировали по поглощению белка на 280 нм. Фракционирование начинали спустя 4.18 мл после инъекции образца, собирали фракции объемом 500 мкл до выхода 24 мл. Хроматографическое разделение выполняли в автоматическом режиме по следующему протоколу, записанному в управляющей программе:

Column	Superose_6_10/300_GL
FlowRate_Equil	0.300 {ml/min}
Wavelength_1	280 {nm}
FlowRate_WashOut	0.300 {ml/min}
Empty_loop_with	0.15 {ml}
FlowRate_Elution	0.300 {ml/min}
Length_Before_Frac	4.00 {ml}
TubeType_EluateFrac	12mm
Eluate_Frac_Size	0.500 {ml}
Length_with_Frac	20.00 {ml}

В каждой фракции было определено содержание общего белка методом Бредфорда с использованием планшетного ридера ClarioStar («BMG», Германия).

Анализ профиля распределения липопротеинов во фракциях плазмы крови, полученных методом гель-фильтрации. Масс-спектрометрия апобелков

LC-MS/MS-анализ выполняли на масс-спектрометре micrOTOF-QII («Bruker Daltonik», Германия) с ионизацией в источнике CaptiveSpray («Bruker Daltonik», Германия), сопряжённом с системой ультраэффективной наножидкостной хроматографии nanoElute UHPLC («Bruker Daltonik», Германия).

Восстановление остатков цистеина осуществляли путём добавления в каждую фракцию, содержащую 10 мкг общего белка, раствора ТСЕР (10 мМ) и САА (40 мМ) с последующей инкубацией при 37 °С в течение 15 мин. Протеолиз проводили путём добавления 10 мкл раствора трипсина (20 мкг/мл) в 50 мМ аммоний бикарбонатном буфере. В случаях, когда по методу Бредфорда содержание белка не определялось, к 200 мкл фракции добавляли 5 мкл раствора трипсина. Инкубацию образцов осуществляли при 37 °С в течение 16 ч в термостате BE 400 («MEMMERT», Германия).

Обессоливание образцов выполняли с использованием C18 SPE-дисков («Supelco», США). Каждый образец ресуспендировали и наносили 1 мкл на колонку-ловушку Acclaim™ PepMap™ C18 (5 мкм, 0.3×5 мм, «ThermoFisher Scientific»), предварительно подкислив раствором 0.1% муравьиной кислоты, при давлении 400 бар. Разделение пептидов проводили на колонке AuGo Ultimate CSI C18 UHPLC (1.7 мкм, 120 Å, 75×250 мкм,

«IonOpticks», Австралия) при скорости потока 300 нл/мин и температуре 50 °С. Элюирование выполняли с использованием подвижных фаз: А — вода/0.1% муравьиная кислота (v/v), В — ацетонитрил/0.1% муравьиная кислота (v/v). Градиент: 2 – 45% фазы В за 40 мин, затем повышение до 95% В за 0.5 мин, удержание на уровне 95% в течение 15 мин и восстановление до 2% для следующей хроматограммы.

Масс-спектрометрическую регистрацию выполняли в режиме положительных ионов со следующими параметрами: температура осушающего газа — 150 °С, расход — 3 л/мин, напряжение на капилляре — 1500 В. Диапазон масс в режиме полного сканирования составлял 150–2200 m/z при скорости 2 Гц. MS/MS-анализ проводили в автоматическом режиме с фиксированным временем цикла 3 с; спектры собирали с разрешением 8–32 Гц при выборе ионов-предшественников с зарядом от +2 до +4.

Обработку полученных спектров выполняли в программном обеспечении Bruker Compass DataAnalysis 5.1 («Bruker Daltonik», Германия). Объединённый список пиков экспортировали в формате Mascot Generic Format (*.mgf) и использовали для идентификации в поисковой системе Mascot v.2.3.0 («Matrix Science», Великобритания) с базой данных SwissProt (таксон *Homo sapiens*). Параметры поиска: фермент — трипсин, до одного пропущенного сайта, переменные модификации — дезамидирование и окисление; допуск по массам — 40 ppm (MS) и 0.2 Da (MS/MS); предпочтительный заряд — от +2 до +4.

Результаты идентификации экспортировали в формате CSV. Из общего списка выбирали аполипопротеины (А-1, В-100) и извлекали соответствующие значения emPAI, на основе которых строили графики распределения липопротеинов (рис. 1А, В).

Иммуноферментный анализ (ИФА) апобелков

Концентрации аполипопротеинов (А-1 для ЛВП и В-100 для ЛНП) во фракциях плазмы крови были определены с помощью ИФА. Для определения концентраций А-1 или В-100 образец хроматографической фракции плазмы крови разводили предварительно в 1000 или в 50 раз, соответственно. Процедуры пробоподготовки и анализа выполняли согласно инструкции производителя.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Профилирование плазмы крови человека выполнено с помощью высокоэффективной гель-хроматографии. Образец плазмы крови человека был разделён с помощью гель-фильтрации. Было собрано 30 фракций (рис. 1) объемом 500 мкл каждая.

LC-MS/MS-анализ полученных фракций позволил определить значения emPAI для апо-белков А-1 и В-100, входящих в состав ЛВП и ЛНП, соответственно (рис. 1 А и В).

Соответственно полученным значениям emPAI были выбраны хроматографические фракции с преимущественным содержанием ЛВП (фракции 22-25, соответствующие преимущественному содержанию А-1) и ЛНП (фракции 15-19, соответствующие преимущественному содержанию В-100). Фракции 8-10, в которых также содержится В-100, соответствуют ЛОНП.

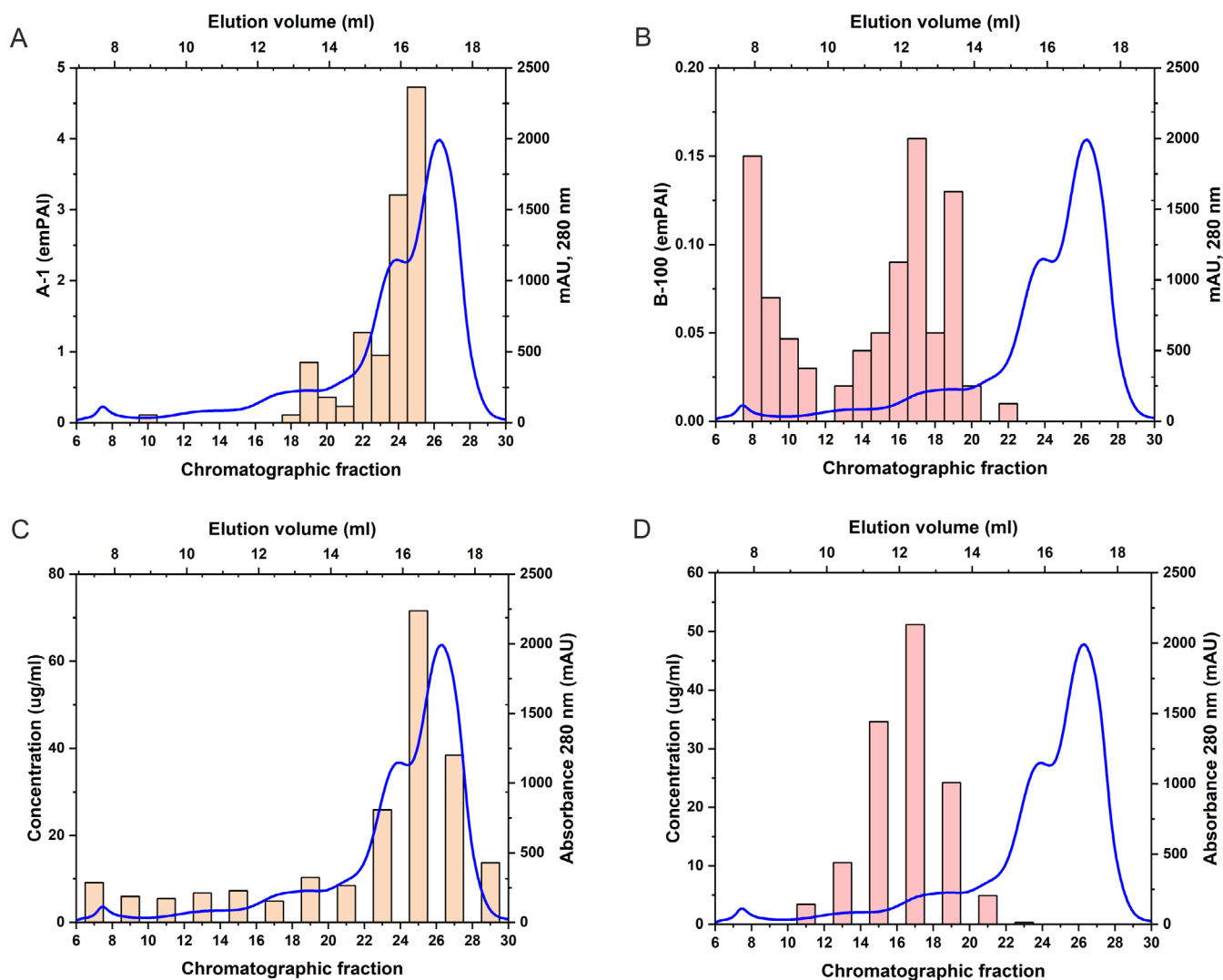


Рисунок 1. Хроматограмма плазмы крови человека и распределение А-1 и В-100 во фракциях. Синим цветом обозначена хроматограмма плазмы крови, согласно данным оптической плотности при длине волны 280 нм, желтым – распределение А-1 в хроматографических фракциях согласно значению emPAI (А) и результатам ИФА (С), розовым – распределение В-100 в хроматографических фракциях согласно значению emPAI (В) и результатам ИФА (D).

В хроматографических фракциях плазмы крови человека с помощью ИФА было измерено содержание аполипопротеинов А-1 (маркер ЛВП) и В-100 (маркер ЛНП). Данные по распределению А-1 и В-100 в хроматографических фракциях плазмы крови человека, полученные методом ИФА, представлены на рисунке 1 С и D. Наиболее высокие концентрации В-100 были обнаружены во фракциях 13-21, а наиболее высокие концентрации А-1 - во фракциях 21-29, что согласуется с результатами масс-спектрометрического анализа.

Таким образом, нами были выделены фракции ЛНП и ЛВП из плазмы крови человека и осуществлена кросс-валидация протокола определения фракций плазмы крови человека с преимущественным содержанием ЛНП или ЛВП методом LC-MS/MS.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Форма информированного согласия и информационного листка доноров утверждена протоколом №309 независимого комитета по этике при «Артемедассистанс» от 25.10.2023.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа была выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021 - 2030 годы) (№1220301001682).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tsukahara, T., Tsukahara, R., Haniu, H., Matsuda, Y., & Murakami-Murofushi, K. (2015). Cyclic phosphatidic acid inhibits the secretion of vascular endothelial growth factor from diabetic human coronary artery endothelial cells through peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 412, 320-329. DOI: 10.1016/j.mce.2015.05.021
2. Jonas, A., & Phillips, M.C. (2008). *Lipoprotein structure*. In *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes* (D.E. Vance and J.E. Vance eds.) Elsevier, pp. 485-506. DOI: 10.1016/B978-044453219-0.50019-2
3. Yang, L., Fan, B., Yang, K., & Zhu, H. (2012). A simple and sensitive method for lipoprotein and lipids profiles analysis of individual micro-liter scale serum samples. *Chemistry and Physics of Lipids*, 165(2), 133-141.

DOI: 10.1016/j.chemphyslip.2011.11.010

4. Blanchard, V., Garçon, D., Jaunet, C., Chemello, K., Billon-Crossouard, S., Aguesse, A., Garfa, A., Famchon, G., Torres, A., Le May, C., Pichelin, M., Bigot-Corbel, E., Lambert, G., Cariou, B., Hadjadj, S., Krempf, M., Bach-Ngohou, K., & Croyal, M. (2020). A high-throughput mass spectrometry-based assay for large-scale profiling of circulating human apolipoproteins. *Journal of Lipid Research*, 61(7), 1128-1139. DOI: 10.1194/jlr.D120000835

5. Collins, L.A., Mirza, S.P., Kissebah, A.H., & Olivier M. (2010). Integrated approach for the comprehensive characterization of lipoproteins from human plasma using FPLC and nano-HPLC-tandem mass spectrometry. *Physiological Genomics*, 40(3), 208-215. DOI: 10.1152/physiolgenomics.00136.2009

6. Kim, K.W., McCormick, J., Helmering, J., Véniant, M.M., & Wang, M. (2008). An optimized fast-performance liquid chromatography method for analyzing lipoprotein profiles using microliter volumes of serum. *Analytical Biochemistry*, 376(2), 268-274. DOI: 10.1016/j.ab.2008.02.028

7. Hirowatari, Y., & Yoshida, H. (2019). Innovatively established analysis method for lipoprotein profiles based on high-performance anion-exchange liquid chromatography. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, 26(12), 1027-1040. DOI: 10.5551/jat.RV17037

8. McConathy, W.J., Koren, E., Wieland, H., Campos, E.M., Lee, D.M., Kloer, H.U., & Alaupovic, P. (1985). Evaluation of immunoaffinity chromatography for isolating human lipoproteins containing apolipoprotein B. *Journal of Chromatography*, 342(1), 46-66.

9. Liangsupree, T., Multia, E., Metso, J., Jauhiainen, M., Forssén, P., Fornstedt, T., Öörni, K., Podgornik, A., & Riekkola, M.L. (2019). Rapid affinity chromatographic isolation method for LDL in human plasma by immobilized chondroitin-6-sulfate and anti-apoB-100 antibody monolithic disks in tandem. *Scientific Reports*, 9(1), 11235. DOI: 10.1038/s41598-019-47750-z

10. Multia, E., Liangsupree, T., Jussila, M., Ruiz-Jimenez, J., Kemell, M., & Riekkola, M.L. (2020). Automated on-line isolation and fractionation system for nanosized biomacromolecules from human plasma. *Analytical Chemistry*, 92(19), 13058-13065. DOI: 10.1021/acs.analchem.0c01986

11. Hall, M. (2018). *Size exclusion chromatography (SEC)*. In *Biopharmaceutical Processing* (G. Jagschies, E. Lindskog, K. Łacki, and P. Galliher eds.) Elsevier, pp. 421-432.

DOI: 10.1016/B978-0-08-100623-8.00021-9

Поступила: 19.05.2026

После доработки: 05.06.2026

Принята к публикации: 09.06.2026

PROTOCOL FOR THE PREPARATIVE ISOLATION OF LDL AND HDL FRACTIONS FROM HUMAN BLOOD PLASMA

L.A. Kaluzhskiy, E.O. Yablokov, I.Yu. Toropygin, M.A. Konstantinov, O.V. Gnedenko*, Y.V. Mezentssev, A.S. Ivanov, A.I. Archakov

Institute of Biomedical Chemistry, 10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; *e-mail: gnedenko.oksana@gmail.com

The pathogenesis of atherosclerosis, the main cause of cardiovascular disease, including coronary heart disease and stroke, involves plasma lipoproteins, which differ in protein and lipid composition, size, charge and function. At present, chromatographic methods, in particular gel filtration (SEC), are widely used to isolate lipoproteins. In this article, we present a protocol for the preparative isolation of low-density lipoprotein (LDL) and high-density lipoprotein (HDL) fractions from human blood plasma using gel chromatography. To determine the boundaries of the elution zones of apolipoproteins A-1 and B-100, HDL and LDL markers, respectively, we used liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) with ELISA cross-validation. Lipoprotein fractions obtained with the help of the SEC can be used for various studies of scientific and applied importance.

Key words: blood plasma lipoproteins; LONP, LDL, HDL; high-performance gel chromatography; mass spectrometry identification of apoproteins

FUNDING

The work was carried out within the framework of the Program for Basic Research in the Russian Federation for a long-term period (2021–2030) (No. 122030100168-2).

Received: 19.05.2026, revised: 05.06.2026, accepted: 09.06.2026