

• 方法技术 •

肝细胞膜低密度脂蛋白受体酶联免疫测定法的建立

吴新伟 傅明德 刘秉文 蓝德宾

(华西医科大学生物化学与分子生物学研究所, 成都 610041)

Enzyme Linked Immunosorbent Assay of Low Density Lipoprotein Receptors on Liver Plasma Membranes

WU Xin-Wei, FU Ming-De, LIU Bing-Wen and LAN De-Bin

(Institute of Biochemistry and Molecular Biology, West China University of Medical Sciences, Chengdu 610041, China)

ABSTRACT

Aim An enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) using HRP-conjugated rabbit antihuman plasma apo B100 IgG was developed for measurement of low density lipoprotein(LDL) receptors on purified rabbit liver plasma membranes.

Methods Membrane protein adhered to the solid phase by an overnight incubation, and was quantified by measuring the protein concentrations before and after coating. A curve of anti-apo B100 IgG binding to known amounts of LDL was constructed to quantify the LDL bound. Parallel samples with 25-fold excess rabbit plasma LDL were assayed to detect nonspecific binding.

Results Kd and Bmax, worked out by scatchard plot, were 13.59 mg/L and 124 μg/g membrane protein(n=5), respectively.

Conclusions The results support the use of ELISA to measure LDL receptors, particularly for physiologic studies.

KEY WORDS Receptor, low density lipoprotein; Liver plasma membrane; Enzyme linked immunosorbent assay

摘要 实验建立了检测肝细胞膜低密度脂蛋白受体的抗配体抗体酶联免疫吸附测定法。测定中,固相膜

受体蛋白量由包被前后膜蛋白浓度差值计算确定;低密度脂蛋白结合量按双抗体夹心法制作的低密度脂蛋白标准曲线确定;膜蛋白非特异吸附则用与酶联抗体来源相同的同种动物血浆低密度脂蛋白平行抑制试验消除。兔肝细胞膜低密度脂蛋白受体结合活性经 Scatchard 作图, $K_d = 13.6 \text{ mg/L}$, $B_{max} = 124 \text{ μg/g}$ 膜蛋白($n=5$)。测定结果说明建立的方法安全可靠,能反映受体的结合活性,在高脂血症及心血管病的研究中具有广泛的应用价值。本研究还对选择确定受体包被浓度、酶联物稀释度等的棋盘滴定方法作了详细介绍和讨论。

关键词 低密度脂蛋白受体;肝细胞膜;酶联免疫吸附测定法

低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)受体是广泛存在于各种组织细胞膜的跨膜糖蛋白^[1],与机体胆固醇代谢密切相关。血浆胆固醇主要存在于 LDL 中,而约 75%的血浆 LDL 依赖肝细胞表面的 LDL 受体清除,肝细胞膜 LDL 受体在血浆胆固醇和脂蛋白代谢中起着重要的作用^[2]。建立不影响配体与受体生物学结合特性的抗配体抗体酶联免疫分析法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA),深入研究肝细胞膜 LDL 受体的结合特性,对于阐明动脉粥样硬化的发病机理有着重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料及试剂

日本大耳白兔,由本校实验动物中心提供;正常人血浆采自献血员;96孔聚苯乙烯酶标板,美国 Corning 公司产品;兔抗人载脂蛋白 B100 IgG、HRP-兔抗人载脂蛋白 B100 IgG 均由本实验室制备^[3]。肝细胞膜及抗载脂蛋白 B100 IgG 包被缓冲液为 pH 9.6, 50 mmol/

L Na₂CO₃-NaHCO₃ 缓冲液; 洗涤及稀释缓冲液为 pH 7.4, 含 0.25% Tween-20 的 20 mmol/L PBS; 酶反应基质液为 pH 6.5, 含 0.04% 邻苯二胺、0.15% H₂O₂ 的 0.1 mol/L 柠檬酸-Na₂HPO₄ 缓冲液(临用前配制)。

1.2 脂蛋白的制备

按一次性密度梯度超速离心法^[4]分离人血浆及兔血浆脂蛋白。收集 $d=1.030\sim 1.050$ g/ml 的 LDL 组分, 及 $d=1.120\sim 1.175$ g/ml 的 HDL 组分, 对 10 mmol/L Tris-HCl、1 mmol/L EDTA、50 mmol/L NaCl, pH 7.4 的缓冲液透析脱盐, 4℃ 保存备用。

1.3 兔肝细胞膜的制备

按蔗糖密度梯度超速离心法^[5]纯化兔肝细胞膜。收集 37%~41% 蔗糖密度界面膜成分, 用缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L NaCl, 0.5 mmol/L CaCl₂, pH 7.5) 稀释后, 于 27 000×g 离心 20 min。收集沉淀, 加少量缓冲液, 用 MSE-150 型超声波仪于冰浴中处理 2×10 S, 振幅 14~16。制备的肝细胞膜分装后于 -70℃ 保存。膜产率为 1.0~1.5 mg/g 湿肝组织, 与肝匀浆比较, 5'-核苷酸酶活力提高 7~10 倍。

脂蛋白及膜蛋白均按 Markwell 等^[4]的方法测定蛋白质含量。

1.4 受体结合试验

1.4.1 测定步骤 LDL 受体结合试验按抗配体抗体酶联免疫测定直接法^[7]的程序进行:

- 肝细胞膜包被(200 μl, 4℃ 过夜)
- ↓ 洗涤(3 次, 每次 3 min)
- LDL(200 μl, 37℃, 2 h)
- ↓ 洗涤(同上)
- HRP-抗载脂蛋白 B100 IgG(200 μl, 37℃, 2 h)
- ↓ 洗涤(同上)
- 基质液(200 μl, 37℃, 30 min)
- ↓ 2 mol/L H₂SO₄ 终止反应(50 μl)

于 492 nm 测定光密度值(以未加 LDL 孔作为空白对照)。

1.4.2 膜蛋白吸附量的确定 首先将上述经 4℃ 包被过夜的酶标板各孔中的膜蛋白液全部吸出, 然后分别测定各孔吸出液及包被原液的蛋白含量, 其差值即为酶标板各孔内吸附的膜蛋白量。当包被浓度为 0.25 g/L 时, 孔内吸附的膜蛋白量为每孔 0.550±0.034 μg (每板测定 10 孔, 5 板测定的平均值±标准差)。

1.4.3 膜蛋白包被及酶联抗体稀释度的确定 选择双倍稀释的膜蛋白(62.5, 125, 250, 500 mg/L)及 HRP-抗载脂蛋白 B100 IgG(1:125, 1:250, 1:500, 1:1000 稀释)进行棋盘滴定, 确定膜蛋白及 HRP-抗

载脂蛋白 B100 IgG 的工作浓度。

1.4.4 LDL 结合量的标准曲线 采用双抗体夹心法^[2], 首先以上述棋盘滴定确定的 HRP-抗载脂蛋白 B100 IgG 的工作浓度, 选择抗载脂蛋白 B100 IgG 的饱和包被浓度。然后在此条件下绘制人血浆 LDL 结合量(3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 ng)的标准曲线。

1.4.5 LDL 受体结合活性测定 按受体棋盘滴定确定的条件进行。其中非特异结合通过同时加入与抗载脂蛋白 B100 IgG 同种动物(家兔)血浆 LDL(过量 25 倍)的平行试验确定。结合到膜受体上的 LDL 量由测定的 492 nm 处光密度值查 LDL 结合量标准曲线确定。标准曲线与受体活性测定在同一酶标板内完成。

2 结果

2.1 低密度脂蛋白受体棋盘滴定

如图 1(Figure 1)所示, 测得 492 nm 处光密度值随膜蛋白及酶联抗体浓度增加, 呈可饱和的矩形双曲线。当膜蛋白浓度为 0.25 g/L、HRP-抗载脂蛋白 B100 IgG 稀释度为 1:250 时, 492 nm 处光密度值达到最大, 选择此条件进行受体结合活性测定。

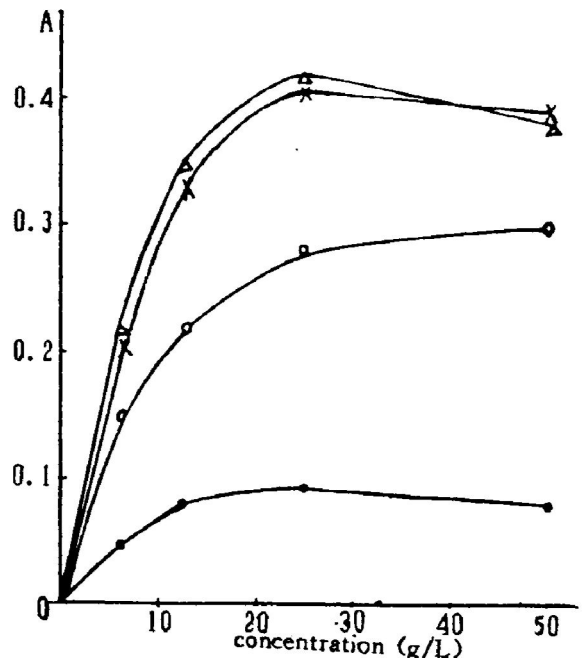


Figure 1. Chess board titration for the binding curve.

Dilution of enzyme linked antibody, x-x: 1:125, △-△: 1:250, o-o: 1:500, ●-●: 1:1000.

2.2 低密度脂蛋白结合量的标准曲线

低密度脂蛋白结合量的标准曲线如图 2 (Figure 2) 所示, 492 nm 处光密度值与 LDL 结合量在 0~50 ng 范围内呈直线关系。

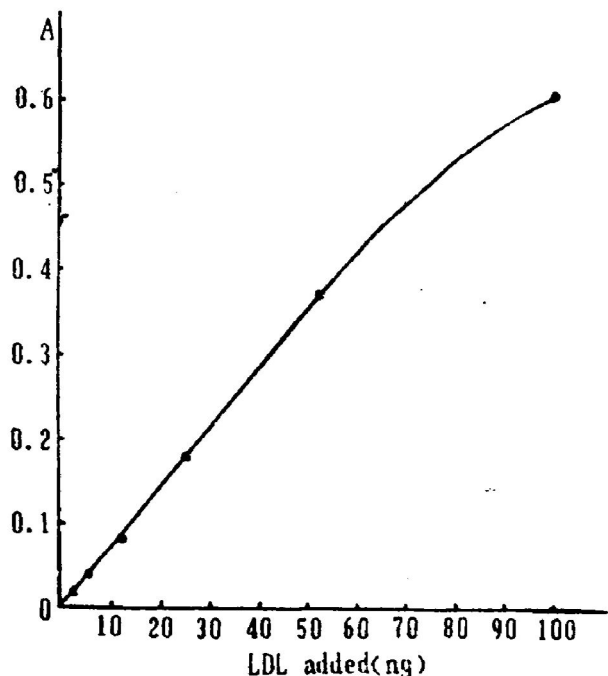


Figure 2. Standard curve for quantitation of LDL binding.

2.3 同种动物血浆脂蛋白对受体结合试验的影响

用过量的不同倍数的、与酶联抗体来源一致的同种动物(家兔)血浆 HDL、LDL 及人血浆 HDL 进行兔肝细胞膜 LDL 受体竞争结合试验。结果见图 3 (Figure 3), 兔血浆 LDL 过量 2 倍即可抑制人血浆 LDL 与兔肝细胞膜 LDL 受体结合的 50%, 过量 20 倍可抑制 90% 以上; 而人及兔血浆 HDL 则不表现抑制作用。

2.4 受体饱和曲线及 Scatchard 作图分析

由图 4 (Figure 4) 可见, LDL 的特异性结合量随加入的 LDL 蛋白浓度增加而增加, 呈可饱和趋势。Scatchard 作图呈直线, $K_d = 13.6$ mg/L, $B_{max} = 124$ μ g/g 膜蛋白 ($n = 5$)。

2.5 Ca^{2+} 对受体结合的影响

于反应体系中加入 0~10 mmol/L $CaCl_2$, 结果如图 5 (Figure 5) 所示, LDL 的特异性结

合量随着 Ca^{2+} 浓度增大而增大, 到 6 mmol/L 时达到最大。

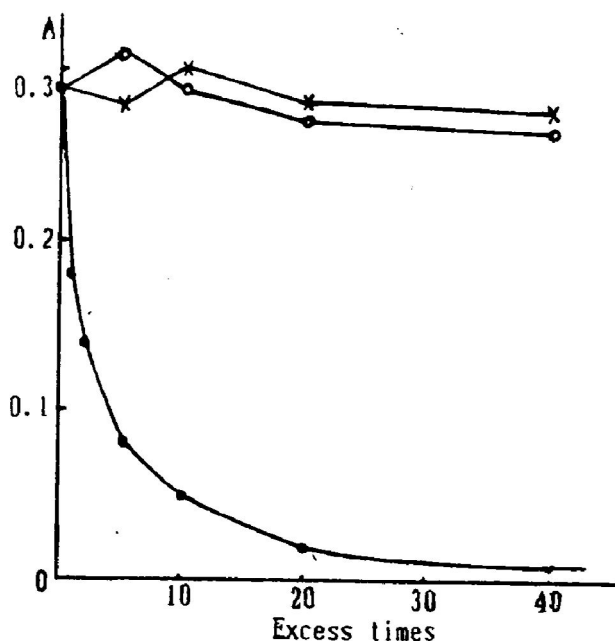


Figure 3. Effect of rabbit HDL, LDL and human HDL on the binding of human LDL to rabbit liver plasma membranes. ●-●: rabbit LDL, ○-○: rabbit HDL, ×-×: human HDL.

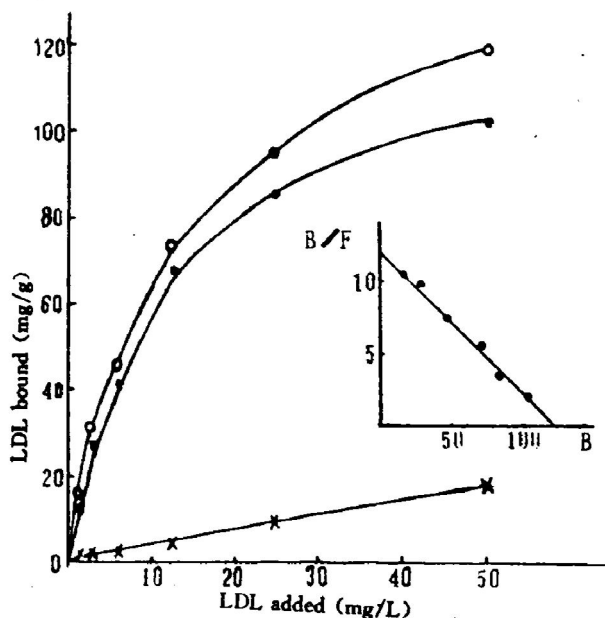


Figure 4. Binding curve of human LDL to rabbit liver plasma membranes; Scatchard plot of the specific binding. ○-○, TB, ●-●, SB, ×-×, NSB.

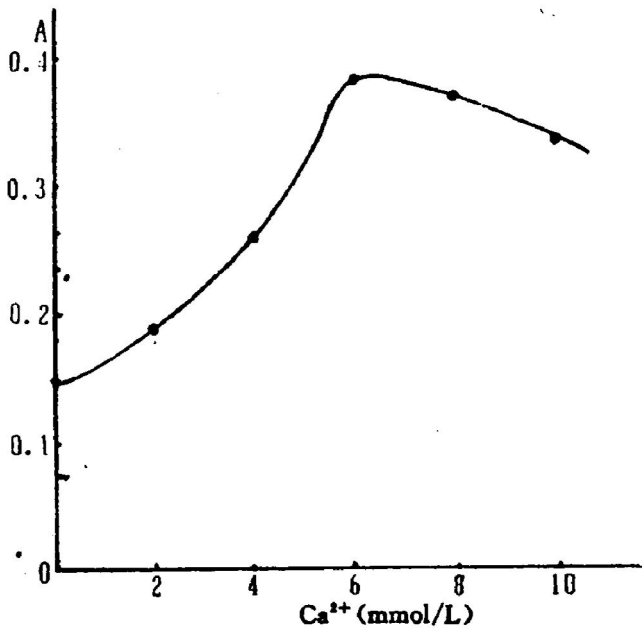


Figure 5. Effect of Ca²⁺ on the binding of human LDL to rabbit liver plasma membranes.

3 讨论

本文建立了一种检测肝细胞膜低密度脂蛋白受体的抗配体抗体酶联免疫测定法。LDL与吸附在酶标板上的肝细胞膜 LDL 受体发生生物学结合反应后,再与 HRP-抗载脂蛋白 B100 IgG 发生免疫学结合反应。最后,通过固相上的受体-配体-抗配体抗体-酶复合物中酶催化的显色反应检测 LDL 受体活性。

受体检测时,酶交联物的工作浓度由棋盘滴定选择在膜蛋白饱和包被浓度下,可使固相酶复合物发挥最大催化活性的最高 HRP-抗载脂蛋白 B100 IgG 稀释度确定,检测的灵敏度高、酶交联物的用量小;结合到酶标板上的固相膜受体蛋白量由包被前后膜蛋白浓度差值计算确定;LDL 结合量则按双抗体夹心法,在受体检测同一酶标板上,由受体棋盘滴定选定酶交联物工作浓度制作的 LDL 结合量标准曲线确定,当加入的 LDL 很少时,由于抗体-抗原呈零级反应^[8],因此由酶显色的光吸收值可以查得

LDL 的结合量。此外,本试验采用可与膜受体发生生物学结合反应,但不能与 HRP-抗载脂蛋白 B100 IgG 发生免疫学结合反应的同种动物(家兔)血浆 LDL 的平行试验,消除膜蛋白的非特异吸附作用。经竞争性抑制试验证实、简便、可行。

实验结果表明,人血浆 LDL 与兔肝细胞膜 LDL 受体的结合具高度特异性、可逆性,且需 Ca²⁺ 存在。经 Scatchard 作图得到的 Kd 值与 Bmax 值与文献报道一致^[2]。

本方法既无放射性污染,又避免了因交联剂的使用造成 LDL 生物学活性的改变,更能反映受体的结合特性,因此在高脂血症及心血管病等的研究上具有广泛的应用价值。

参考文献

- 1 Schnider WJ, Beisiegel V, Goldstein JL, et al. Purification of the low density lipoprotein receptor, an acidic glycoprotein of 164 000 molecular weight. *J Biol Chem*, 1982, 257; 2 664~672.
- 2 Hael RJ. Regulation of lipoprotein metabolism by lipoprotein receptors. *Atheroscler Rev*, 1988, 17; 1~8.
- 3 傅明德,刘秉文,张荣爵,等. 酶联免疫定量检测人血清载脂蛋白 B100 的研究. *四川医学院学报*, 1985, 16(3); 212~215.
- 4 张林华,刘秉文. 一次性密度梯度超速离心分离人血清脂蛋白. *生物化学与生物物理学报*, 1989, 21; 257~260.
- 5 Ray TK. A modified method of the isolation of the plasma membrane from rat liver. *Biochem Biophys Acta*, 1970, 196; 1~9.
- 6 Markwell MK, Haas SM, Bieber, et al. A modification of lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem*, 1978, 87; 206~214.
- 7 傅明德. 酶受体分析法. 见:曹泽毅(主编),激素受体及其临床应用. 北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1993, 169~176.
- 8 Karen M, kraemer FB, Chen J, et al. ELISA measurement of LDL receptors. *J Lipid Res*, 1990, 31; 1 683~690.

(1996-12-04 收到, 1997-02-28 修回)