

DiI 标记脂蛋白改良法的建立

王建波, 王淳本, 刘志国, 田俊, 屈伸

(华中科技大学同济医学院生物化学教研室, 湖北省武汉市 430030)

[关键词] 荧光标记; 脂蛋白; 受体

[摘要] 为了改进脂蛋白的荧光标记方法, 本实验采用经超速离心后的离心管底层血清取代商品化的去脂血清作为脂蛋白标记时的介质, 与荧光染料 DiI 混合孵育。经超速离心分离后获得 DiI 标记的极低密度脂蛋白、低密度脂蛋白及 β 极低密度脂蛋白。本方法在标记过程中不用去脂血清, 降低了标记成本并缩短了超速离心时间。配体与受体结合实验结果发现, 用本方法标记的脂蛋白能以可饱和方式结合体外培养的小鼠腹腔巨噬细胞和中国仓鼠卵母细胞。表明本方法标记的脂蛋白保持了正常脂蛋白的配体功能, 适用于脂蛋白受体的研究。

[中图分类号] Q78

[文献标识码] A

The Modification on Lipoprotein Labeling Method with DiI

WANG Jian Bo, WANG Chun Ben, LIU Zhi Gou, TIAN Jun, and QU Shen

(Department of Biochemistry, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

[MeSH] Fluorescence labeling; Lipoproteins; Receptor

[ABSTRACT] **Aim** To get a rapid, simple label method for lipoprotein, an improved method was established with the fluorescent probe DiI. **Method** The serum at the bottom of the post-ultracentrifuged tube, instead of lipoprotein deficient serum (LPDS), was used as the medium to applying in lipoprotein labeling.

Results Binding assay showed that the labeled lipoprotein can bind with macrophage and chinese hamster ovocyte (CHO) cells with typical saturable model. The results proved that present method labeling lipoprotein have the normal lipoprotein ligand-binding properties. **Conclusion** This method is simple, rapid and reliable. It could be applied widely in lipoprotein receptor study.

^{125}I 标记脂蛋白是研究脂蛋白与其受体相互作用的经典方法, 灵敏度高^[1,2], 但存在放射性危害。荧光染料取代放射性同位素标记脂蛋白的方法逐渐得到广泛应用。荧光染料 DiI 被认为以类似于磷脂的方式与脂蛋白结合, 最初用于荧光显微镜下观察细胞结合或内吞脂蛋白^[3,4], 并能进行半定量分析^[5,6]。用有机溶剂提取细胞膜受体结合的 DiI 标记的脂蛋白或用 NaOH-SDS 裂解细胞后直接进行荧光分析, 可以定量检测脂蛋白受体活性^[7,8], 这一方法被广泛用于脂蛋白受体结构与功能关系的研究^[9,10]。传统的标记方法需用去脂血清 (lipoprotein deficient serum, LPDS)^[11], 但去脂血清制备困难。因此, 我们尝试对标记方法进行改进, 建立了简便、实用的 DiI 标记脂蛋白的改良法。

1 材料和方法

1.1 仪器与试剂

[收稿日期] 2001-06-24 [修回日期] 2001-11-02

[基金项目] 国家自然科学基金 (39670162) 资助。

[作者简介] 王建波, 男, 1972 年 5 月出生, 博士研究生。王淳本, 男, 1948 年 4 月出生, 主管技师, 教研室副主任。屈伸, 男, 1954 年 8 月出生, 博士研究生导师, 副院长, 教研室主任。

超速离心机 (L8-80M, Beckman, USA)、二氧化碳培养箱 (Shellab, USA)、荧光显微镜 (Bx60, Olympus, Japan)、荧光分光光度计 (U-850, Hitachi, Japan)、超净工作台 (苏州净化设备公司)、可见光-紫外分光光度计 (U-2000, Hitachi, Japan)、CHO-K1 细胞株 (CCTCC) 和 DiI (1, 1'-dioctadecyl-3, 3, 3', 3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate; 分子探针, USA)。

1.2 脂蛋白的 DiI 标记

1.2.1 获取脂蛋白 正常人全血 EDTA-Na₂ (2 g/L) 抗凝, 4℃下分离血浆, 加叠氮钠 (NaN₃) 和苯甲基磺酰氟 (PMSF), 使其终浓度分别为 1 mmol/L 和 10 mmol/L, 4℃下 12 000 r/min 离心 30 min, 除去乳糜微粒, 用 NaBr 调血浆密度 $d=1.100\text{ kg/L}$, 55 000 r/min 离心 4 h, 取上层混合物, 一部分用平衡盐缓冲液于 4℃透析 24 h 直接用于标记, 其余按本室方法^[10]分离极低密度脂蛋白 (very low density lipoprotein, VLDL) 和低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL), 所得 VLDL 于 4℃透析 24 h, 聚乙二醇浓缩, Lowry 法进行蛋白定量。

1.2.2 制备去脂血清 调血浆密度 $d=1.25\text{ kg/L}$, 超速离心 48 h 获得。

1.2.3 配制 DiI 贮液 称取 15 mg DiI 溶于 1 mL 二甲亚砜(DMSO)。

1.2.4 脂蛋白标记 2 mg VLDL 溶于 4 mL LPDS 后加 DiI 贮液 40 μ L。④2 mg VLDL 溶于 4 mL 牛血清白蛋白(BSA)后加 DiI 贮液 40 μ L。④2 mg VLDL 溶于 4 mL 平衡盐缓冲液后加 DiI 贮液 40 μ L。

一漂混合物 4 mL 加 DiI 贮液 40 μ L。各组均置 37℃保温 15 h 后, 55 000 r/min 离心 4 h, 取上层 DiI-VLDL, 一漂混合物组中可同时取 DiI-VLDL 和 DiI-LDL。用平衡盐缓冲液于 4℃透析 24 h, 经过 Sephadex G25 凝胶柱, 检验游离 DiI 与 DiI-VLDL 的分离效果。用 Lowry 法测定蛋白含量。

1.3 兔 β -极低密度脂蛋白的 DiI 标记

新西兰白兔喂含 3% 胆固醇的饲料, 8 周后颈动脉取血。EDTA- Na_2 (2 g/L) 抗凝, 4℃下分离血浆, 加 NaN_3 和 PMSF 使其终浓度分别为 1 mmol/L 和 10 mmol/L, 4℃12 000 r/min 离心 30 min, 除去乳糜微粒。用 NaCl 调血浆密度为 1.100 kg/L, 上铺密度 $d=1.063$ kg/L 及 $d=1.006$ kg/L 的梯度液, 55 000 r/min 离心 4 h, 取上层 β -VLDL 和底层的血清, PBS 透析 24 h。用 Lowry 法测定蛋白质含量。用 PBS 将 β -VLDL 和血清的蛋白含量分别稀释至 1 mg/L 和 4 g/L。取 4 mg β -VLDL 与 8 mL 稀释过的血清, 混匀, 加入 DiI 贮液 50 μ L, 再次混匀, 37℃放置 15 h, 取出后, 于 55 000 r/min 超速离心 4 h, 取上层 DiI- β -VLDL, PBS 透析 24 h 后贮存备用。

1.4 标准系列的配制

DiI、DiI-VLDL、DiI- β -VLDL 溶于细胞裂解液中以制备不同浓度的标准液, 浓度范围分别为 DiI 15~150 μ g/L, DiI-VLDL 100~1 000 μ g/L, DiI- β -VLDL 100~2 000 μ g/L。测定荧光强度(激发波长 522 nm, 发射波长 566 nm)。

1.5 巨噬细胞结合 DiI-低密度脂蛋白

按 Goldstein 等法收集小鼠腹腔巨噬细胞, 悬浮于含 10% 新生小牛血清(NCS)、100 ku/L 青霉素和 100 ku/L 链霉素的 DMEM 中, 混匀后分装于 35 mm 培养基中, 37℃5% CO_2 条件下温育 3 h, 用 DMEM 洗去未贴壁的细胞, 再培养 24 h。培养的巨噬细胞用 PBS 洗三遍, 加入含 DiI-LDL 的 DMEM, 浓度分别为 5、10、20、40、80 及 120 mg/L, 置 4℃4 h, 以含 0.4% BSA 的 PBS 洗两遍, 再用 PBS 洗三遍, 加细胞裂解液 1 mL, 置室温轻轻振摇 1 h, 取 50 μ L 测蛋白, 500 μ L 测荧光。

1.6 中国仓鼠卵母细胞结合 DiI-极低密度脂蛋白

中国仓鼠卵母细胞(chinese hamster ovocyte, CHO)于含 10% NCS 的 DMEM, 5% CO_2 条件下培养。为抑制细胞中的 LDL 受体活性, 结合实验前加胆固醇、25-羟胆固醇于 DMEM 中, 使终浓度分别为 10 mg/L、1 mg/L。置 37℃5% CO_2 条件下培养 24 h。用 PBS 洗三遍, 加入含 DiI-VLDL 的 DMEM, 浓度分别为 5、10、20、40、80 mg/L, 4℃2 h 后, 用含 0.4% BSA 的 PBS 洗两遍, PBS 洗三遍, 加细胞裂解液 1 mL, 置室温轻轻振摇 1 h, 取 50 μ L 测蛋白, 500 μ L 测荧光。

1.7 中国仓鼠卵母细胞结合 DiI- β -低密度脂蛋白

操作方法同 1.6。

1.8 DiI- β -极低密度脂蛋白的结合与内吞

巨噬细胞、CHO 细胞接种于内置盖玻片的 35 mm 培养基中。24 h 后, 用 PBS 洗三遍, 加入含 50 mg/L DiI- β -VLDL 的 DMEM, 置 37℃或 4℃, 4 h, 用含 0.4% BSA 的 PBS 洗两遍, 然后再用 PBS 洗三遍, 在荧光显微镜下观察细胞结合情况。

2 结果

2.1 脂蛋白 DiI 标记结果

标记的 VLDL 经超速离心后发现, D 组游离的 DiI 在管底, DiI-VLDL 和 DiI-LDL 分别位于 1.006 和 1.063 的梯度液中; A 组 DiI-VLDL 与游离的 DiI 亦分离良好, DiI 位于管底; B 组和 C 组游离的 DiI 与 DiI-VLDL 未分开。标记后的 DiI- β -VLDL 与游离的 DiI 亦分离, DiI- β -VLDL 位于 1.006 kg/L 的梯度液中。标记的 DiI-VLDL 过凝胶柱只见一个峰, 说明超速后 DiI-VLDL 与游离的 DiI 完全分开。

2.2 标准曲线

图 1(Figure 1) 显示, DiI 的荧光值在 5~90 μ g/L 范围内呈良好的线性关系。图 2 和 3(Figure 2 and 3) 显示, DiI-VLDL、DiI- β -VLDL 分别在 100~800 μ g/L、100~1 600 μ g/L 范围内呈良好的线性关系, 且一漂混合物组的标记效率高于 LPDS 组。

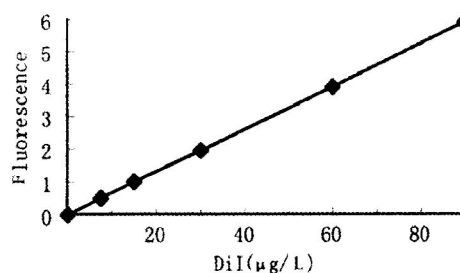


图 1. 细胞裂解液中溶解的 DiI 标准曲线。

Figure. 1 Standard curve of pure DiI dissolved in lysis reagent.

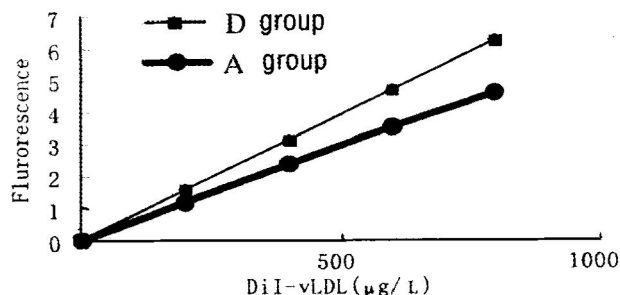


图 2. 细胞裂解液中溶解的 DiI-VLDL 标准曲线。

Figure 2. Fluorescence of DiI-VLDL dissolved in lysis reagent.

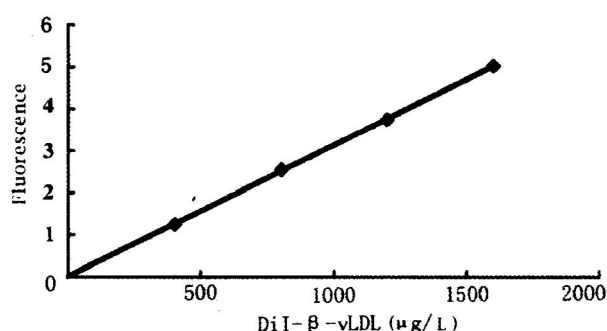


图 3. 细胞裂解液中溶解的 DiI-β-VLDL 标准曲线。

Figure 3. Fluorescence of DiI-β-VLDL dissolved in lysis reagent.

2.3 DiI-低密度脂蛋白和极低密度脂蛋白的结合

巨噬细胞、CHO 细胞在 4℃ 可与 DiI 标记的脂蛋白结合, 且随着 DiI-LDL 和 DiI-VLDL 浓度的增大, 巨噬细胞和 CHO 细胞表现出对 DiI 标记脂蛋白的可饱和性结合(图 4 和 5, Figure 4 and 5)。

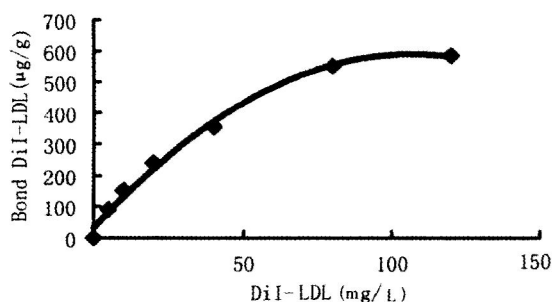


图 4. 鼠巨噬细胞结合的 DiI-低密度脂蛋白反应曲线。

Figure 4. Dose-response measurement of DiI-LDL bind in mouse peritoneal macrophages.

2.4 DiI-β-极低密度脂蛋白的内吞

荧光显微镜观察显示, 细胞于 4℃ 孵育 2 h 后荧光位于细胞边缘, 37℃ 孵育 2 h 后荧光位于细胞内

(图 6, Figure 6)。

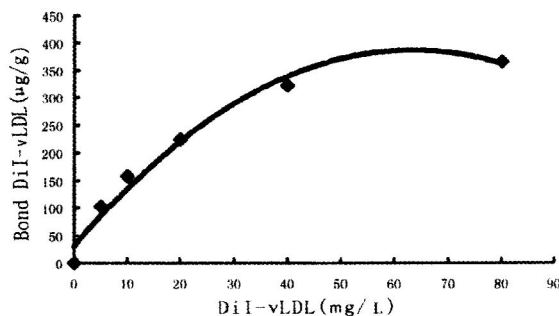


图 5. 中国仓鼠卵母细胞结合的 DiI-极低密度脂蛋白反应曲线。

Figure 5. Dose response measurement of DiI-VLDL binding in CHO cells.

4 讨论

本实验改良了脂蛋白的 DiI 标记方法, 应用于人 VLDL、LDL、兔 β-VLDL 的标记都获得了满意的标记效果。荧光显微镜观察到体外培养的巨噬细胞和 CHO 细胞可结合、内吞本方法标记的 DiI-β-VLDL, 定量分析证明巨噬细胞、CHO 细胞分别以可饱和的方式结合 DiI-LDL、DiI-VLDL。改良的标记法不影响脂蛋白与细胞上相应受体的亲和力, 可用于脂蛋白受体的研究。

传统的 DiI 标记方法需要用去脂血清作为标记介质, 而去脂血清价格昂贵。如果从胎牛血清中分离提取去脂血清, 则需要长时间超速离心。因此, 提取难度大、成本高。采用改良法则可以避免使用去脂血清。本实验用第一次超离后的离心管底层血清替代传统的去脂血清与 β-VLDL 混合后用于标记, 得到了满意的标记效果。其次, 改良法简化了操作步骤。采用改良法, 通过一次超速离心就可完成 DiI 标记与分离, 并且用一漂混合物进行标记可同时得到 DiI-VLDL、DiI-LDL; 而用传统方法则需二次超速离心, 即先超速离心分离 VLDL 和 LDL, 然后再次超速离心分离 DiI 标记的脂蛋白。同时, 改良法标记 β-VLDL 也因不需要制备 LPDS 而缩短了操作时间, 降低了脂蛋白被氧化、降解的可能性。另外, 在改良法中采用密度梯度离心代替了连续密度离心, 使超速离心时间由 18 h 缩短到 4 h, 降低了超速离心机的损耗, 且分离效果良好。过凝胶柱见一个峰, 说明游离的 DiI 与 DiI 标记的脂蛋白完全分开。

本法简便、快速、灵敏, 可用于脂蛋白受体活性的定量、定性分析。为今后研究 VLDL 受体结构与功能的关系提供了一种较合适的方法。

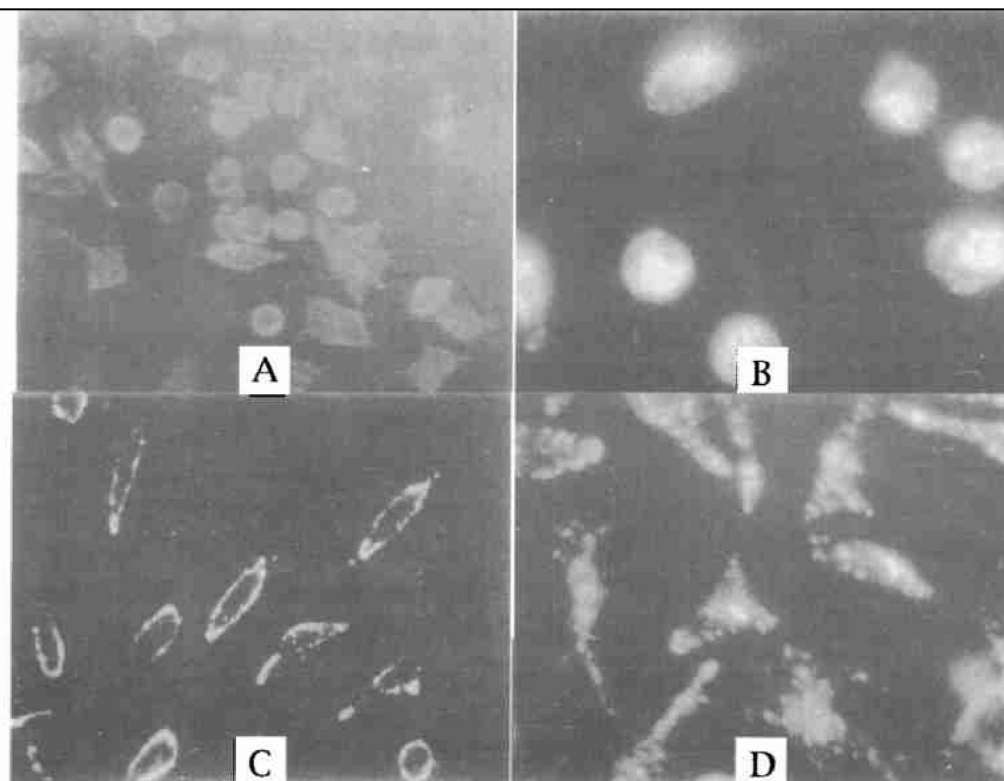


图 6. 鼠巨噬细胞和中国仓鼠卵母细胞结合及内吞荧光标记脂蛋白的显微观察结果.

Figure 6. Microscopic appearance of cellular DiI fluorescence in mouse peritoneal macrophages (A, B) and in CHO cells (C, D).

[参考文献]

- [1] Goldstein JL, Brown MS. Binding and degradation of low density lipoproteins by cultured human fibroblasts. Comparison of cells from a normal subject and from a patient with homozygous familial hypercholesterolemia. *J Biol Chem*, 1974, **249**: 5 153-162
- [2] Goldstein JL, Basu SJ, Brunschede GY, et al. Release of low density lipoprotein from its cell-surface receptor by sulfated glycosaminoglycans. *Cell*, 1976, **7**: 85-95
- [3] Preobrazhensky SN, Ivanov VO, Fuki IV, et al. Enzyme-linked immunoreceptor assay of low density lipoprotein receptors. *Anal Biochem*, 1985, **149**: 269-274
- [4] Beisiegel U, Schneider WJ, Brown MS, et al. Immunoblot analysis of low density lipoprotein receptors in Fibroblasts from subjects with familial hypercholesterolemia. *J Biol Chem*, 1982, **257**: 13 150-156
- [5] Schmitz G, Bruning T, Kovacs E, et al. Fluorescence flow cytometry of human leukocytes in the detection of LDL receptor defects in the differential diagnosis of hypercholesterolemia. *Arterioscl Thromb*, 1993, **13**: 1 053-065
- [6] Stulnig TM, Klocker H, Harwood J, et al. In vivo LDL receptor and HMG-CoA reductase regulation in human lymphocytes and its alterations during aging. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995, **15**: 872-878
- [7] Roach PD, Noel SP. Biotinylation of low density lipoproteins via free amino groups without loss of receptor binding activity. *J Lipid Res*, 1987, **28**: 1 508-514
- [8] Teupser D, Thiery J, Walli AK, et al. Determination of LDL- and scavenger-receptor activity in adherent and nonadherent cultured cells with a new single-step fluorometric assay. *Biochimica Biophysica Acta*, 1996, **1303**: 139-198
- [9] 屈伸, 王建波, 刘志国, 等. 中国人极低密度脂蛋白受体基因的克隆及其在中国仓鼠卵巢细胞中的表达. *中国动脉硬化杂志*, 2000, **8** (3): 189-192
- [10] 冯宁, 周华, 屈伸, 等. 全长及缺失 VLDL 受体基因转染的 CHO 细胞与 β -VLDL 的结合效应. *中国生物化学与分子生物学报*, 2000, **16** (4): 478-482
- [11] Innerarity TL, Pitas RE, Mahley RW. Lipoprotein receptor interactions. *Methods Enzymol*, 1986, **129**: 542-565

(此文编辑 文玉珊)