

单克隆抗体检测糖皮质激素受体的方法

张 斌* 徐 仁 宝

(第二军医大学病理生理教研室, 上海 200433)

提 要

利用两种糖皮质激素受体 (GR) 的单克隆抗体 (Mab) 建立了免疫活性糖皮质激素受体 (GR_{IR}) 的 ELISA 检测法。5 只大鼠肝胞液 GR_{IR}/mg 蛋白为 1.0875 ± 0.0257 (扫描值)。本法特异性好, 适用于没有 GR 纯品, 而 Mab 数量不多条件下 GR_{IR} 的检测, 其原理也适用于其他受体蛋白的测定。

关键词 糖皮质激素受体, 单克隆抗体, ELISA, 图像分析

受体的检测方法是受体研究中的重要课题。当前常用的是放射配体结合法, 它所检测的是受体与标记配基之间的特异结合活性, 有其难以克服的局限性。在病理情况下, 有些受体蛋白分子可能失去了结合活性, 这部分受体蛋白用放射配体结合法就检测不出来; 在生理情况下, 受体蛋白和配体结合后, 可出现解聚、微聚集、内化和核转位等变化, 因此难以确切地了解游离受体的“本来面目”。而以受体的单克隆抗体为探针检测受体正可以克服放射配体结合测定的上述两个缺点。目前这方面的研究工作刚刚起步, 而有关用单克隆抗体来检测糖皮质激素受体 (GR) 的研究至今尚未见文献报告。我们利用两种糖皮质激素受体的单克隆抗体 (Mab) 建立了免疫活性糖皮质激素受体 (GR_{IR}) 的 ELISA 检测方法, 为受体的研究提供了新的检测手段。

材 料 和 方 法

1. 实验材料

动物: SD 大鼠, 150—200g, 雌雄不拘。

GR Mab: N250 由 Okret 惠赠, 其特点是特异识别 GR 的免疫活性区^[1]; BuGR1 由 Harrison 惠赠, 其特点是特异识别 GR 的 DNA 结合区^[2]。[1, 2, 4³H]-去炎松缩酮 ([³H]TA) 和

[1, 2, 4³H] 地塞米松 ([³H]Dex): 英国放化中心产品, 比活性分别为 1.073×10^{12} Bq/mmol (29Ci/mmol) 和 1.702×10^{12} Bq/mmol (46Ci/mmol), 放化纯度约 97%。辣根过氧化物酶标羊抗鼠 IgG: 上海生物制品所产品。电视图像分析系统为西德 Kontron 公司生产的 IBAS 2000 型。

2. 方法

(1) GR 亲和层析柱的制备 按文献 [3] 方法改进, 取 5g Sepharose 4B 溶于交联缓冲液 (0.1mol/L NaHCO₃, 0.5mol/L NaCl, pH 9.0) 中, 加入溶于乙腈的溴化氰 1g (0℃), 振荡混匀并检测其 pH, 用 1mol/L NaOH 调整使 pH 维持在 10 以上。10min 后用 200ml 交联液冲洗, 加入 N250 Mab 20mg, 0—4℃ 搅拌 12 h。在上述 Mab-Sepharose 4B 溶液中加入 50 ml 0.2mol/L 甘氨酸溶液温和搅拌 2h, 再分别用 0.1mol/L 乙酸 50ml、交联液 100ml 及缓冲液 A (10mmol/L HEPES, 1mmol/L EDTA, 10% 甘油, 0.5mol/L NaCl, pH 7.60) 100ml 冲洗, 最后将溶于缓冲液 A 的 Mab-Sepharose 4B 装入带冷凝管的小柱, 保存在冰箱中备用。

(2) 大鼠肝胞液的制备及其 GR_s 的检测方法见文献 [4, 5], 简述如下: 大鼠断头处死后,

* 现在广州第一军医大学微生物教研室。

用缓冲液 B (10mmol/L HEPES, 1mmol/L EDTA, 10% 甘油, 0.1 mol/L NaCl, pH 7.60, 使用前加 0.1% 巯基乙醇) 冲去肝内血液, 将肝脏称重后剪碎, 加 1 倍体积的缓冲液 B, 匀浆后 175000g 离心 30min, 取上清即得肝胞液 (以上操作在 0—4℃ 下进行), 取 0.2ml 肝胞液加 [³H] Dex 40μl, 作双复管为总结合管, 同时在另外双复管中加入浓度高于 [³H] Dex 2 000 倍的 Dex 为非特异结合管, 0—4℃ 孵育 3h, 加 5% DCC 去除游离配基, 液闪计数, 总结合减去非特异性结合则得 GR cpm, 此即为用放射配体结合法测得的 GR 结合量, 简称 GR_B。取 0.1ml 肝胞液用 Lowry 改良法测定蛋白浓度。其余肝胞液按体积加入 [³H]TA, 使其终浓度达到 50μmol/L, 0—4℃ 孵育 6h, 按下述步骤用于纯化。

(3) GR 亲和层析纯化 将上述 [³H]TA 孵育的肝胞液上样于亲和层析柱 (0—4℃ 冰水循环), 先用缓冲液 A 50ml 洗脱杂蛋白, 然后再用 0.1mol/L 乙酸 20ml 将 GR 洗脱, 分管收集洗脱液 2.2ml/管, 共 10 管。将每管收集液各取 0.2ml 加闪液 5ml 液闪计数。收集完毕后, 用 50ml 缓冲液 A 冲洗层析柱, 置冰箱备用。洗脱液蛋白用 Bradford 法测定。

(4) GR 打点杂交 (dot blot) 将 [³H]TA-GR 峰值所在管 (一般都在第 4—8 管) 内洗脱液装入透析袋, 对 10mmol/L PBS 透析 6h, 然后吹干至体积约 0.1ml, 用微量注射器小心全部吸出。根据其体积量和 GR 总 cpm 数计算出 GR cpm/μl 数。以 GR 洗脱峰前的洗脱液作为空白对照, 按同法处理。根据 GR 浓缩液的 cpm/μl 数, 分别计算出 1000, 2000, 到 10000cpm 的相应体积数, 将 GR 浓缩液按一定 cpm 数点样于硝酸纤维素膜 (NC 膜) 上, GR 空白对照液按相同体积点样。

(5) ELISA 检测 按文献 [6] 改进, 上述 NC 膜用 0.05% Tween-20 PBS 洗涤后, 加 3% BSA-PBS 封闭 2h, 弃去封闭液, 加入 1:500 的 BuGR1 Mab 反应液 10ml 孵育 2h, 吸去 Mab 反应液, 用 0.05% Tween-20 PBS 振荡洗涤,

加入 1:100 稀释的辣根过氧化物酶标羊抗鼠二抗反应液 5ml 孵育 1h, 分别用 Tween-PBS 和 PBS 洗涤后, 加新鲜配制的二氨基苯胺底物溶液 10ml, 孵育 20min 后水洗终止反应。将膜片取出晾干。

(6) 图像分析仪扫描定量 该系统的工作程序是电视图像仪摄取膜片图像后, 输入阵列处理计算机, 经模-数转换, 将数字化的图像再输入主计算机系统并在电视监视器上重演, 通过图像增强和灰度编辑, 由主计算机控制电视摄像机进行高速扫描, 逐一对膜片上染色结果的积分面积值进行计算, 即得到免疫活性 GR·(GR_{IR}) 的扫描值。

3. 结果

(1) GR 亲和层析纯化的结果 为了鉴定 N250-Mab-Sepharose 4B 亲和层析柱对 GR 的纯化效果, 取肝胞液分为 A, B 两管, 均加入 50μmol/L (³H)TA, B 管另加 TA 50mmol/L, 分别上柱, 分管收集洗脱液, 液闪计数, 结果如图 1。纯化结果说明纯化倍数和回收率都比较稳定 (见表 1)。

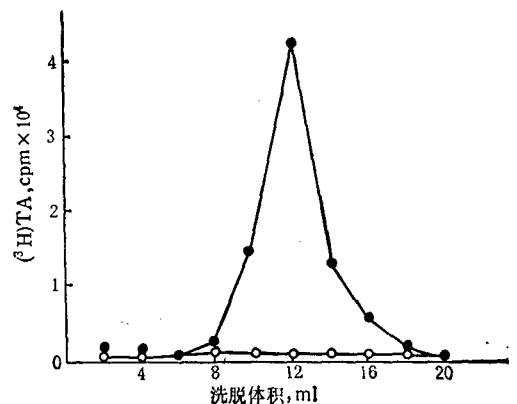


图 1 GR 的亲和层析纯化

(○) 示同时加入 50mmol/LTA, (●) 不加 TA
大鼠肝胞液用 50μmol/L (³H)TA 标记, 然后上样于 N250Mab-Sepharose 4B 亲和层析柱, 用缓冲液 A 洗去杂蛋白后, 再用 0.1mol/L 乙酸将 GR 洗脱下来, 分管收集并测定其液闪计数

(2) ELISA 检测的特异性 将 GR 浓缩液和 GR 空白对照液等体积按一定 cpm 数分别点样于 NC 膜的上、下二排, ELISA 显色结果如图 2, 可见, ELISA 检测的特异性很好。

表 1 $[^3\text{H}]\text{TA-GR}$ 的亲层析纯化结果

动物序号	回收率(%)	纯化倍数
1	60.3	1 052
2	50.7	1 441
3	55.9	1 384
4	53.4	1 362
5	50.2	1 501
$\bar{x} \pm \text{SD}$	54.1 ± 4.2	1348 ± 174

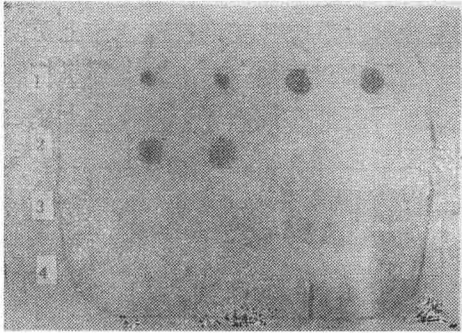


图 2 ELISA 检测的特异性

将纯化的 GR 洗脱液按 1000 cpm 到 7500 cpm (共 6 点)点样于 NC 膜的 1,2 二排。同理将 GR 空白对照液按相同体积数点样于 3,4 二排。用 BuGR1 Mab 进行 ELISA 检测

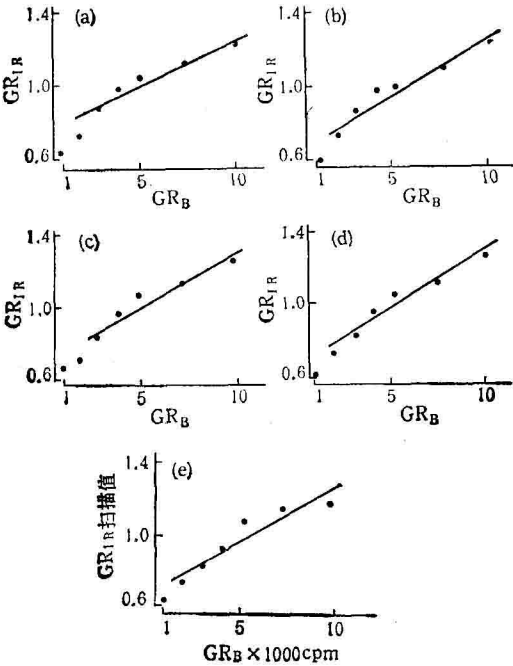


图 3 5 只正常大鼠 $\text{GR}_{\text{IR}}-\text{GR}_{\text{B}}$ 直线

纯化的 GR 洗脱液按 1000—10000 cpm 点样于 NC 膜, 用 BuGR1 进行检测, 再用图像分析仪定量。取 3000—10000 cpm 各点均值进行回归而得 $\text{GR}_{\text{IR}}-\text{GR}_{\text{B}}$ 直线

(3) GR_{B} 对 GR_{IR} 直线 图 3 是 5 只大鼠 GR_{IR} 对 GR_{B} 的直线。由图可见, 当点样量在 2000cpm 以下时, GR_{IR} 对 GR_{B} 直线的线性不好, 故取 3000 cpm 以上各点的均值加以回归, 把它作为正常情况下 GR_{IR} vs GR_{B} 直线 (见图 4)。从 $\text{GR}_{\text{IR}}/\text{GR}_{\text{B}}$ 可以分析 GR 蛋白分子和结合活性的关系, 如此数值增加, 则说明有部分 GR 蛋白没有结合活性。

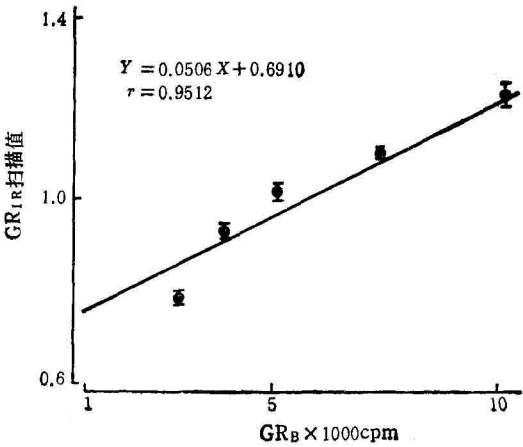


图 4 $\text{GR}_{\text{IR}}-\text{GR}_{\text{B}}$ 回归直线
图上各点示均值±标准差

(4) 大鼠肝胞液 GR_{IR} 扫描值/mg蛋白 由于没有 GR 纯品, 不能测得每毫克蛋白中 GR_{IR} 的质量, 故只能由回归方程式求得 GR_{IR} 扫描值/mg 蛋白, 表 2 为 5 只大鼠 $\text{GR}_{\text{IR}}/\text{mg}$ 蛋白的结果。

表 2 5 只大鼠肝胞液 $\text{GR}_{\text{IR}}/\text{mg}$ 蛋白的扫描结果

动物序号	GR_{B} cpm/mg 蛋白	$\text{GR}_{\text{IR}}/\text{mg}$ 蛋白
1	8335	1.1035
2	8172	1.0953
3	8535	1.1135
4	7233	1.0483
5	7803	1.0769
$\bar{x} \pm \text{SD}$	8016 ± 513	1.0875 ± 0.0257

4. 讨论

用单克隆抗体检测受体要求有高度的特异性。迄今为止, 国外已有 6 个实验室报告制备出了 GR 的 Mab^[1,7-11], 但几乎均针对 GR 的免疫活性区, 只有 Harrison 及其同事获得的 BuGR1 Mab 与 GR 的 DNA 结合区结合, 具

有独特的识别特性,为此,我们就选用了 N250 和 BuGR1 这两种识别 GR 不同部位的 Mab. 同时,由于甾体激素受体的 DNA 结合区高度同源,而其免疫活性区则存在明显的差异^[12],为了避免可能的交叉反应,先用 N250 纯化 GR,然后再用 BuGR1 进行 ELISA 检测,就能提高检测的特异性. 实验结果(图 2)表明,本法的特异性是很好的.

在没有 GR 标准品的条件下,我们以 GR_{IR}/GR_B 分析 GR 蛋白分子和 GR 结合活性的关系,并由此求得 GR_{IR} 扫描值/mg 蛋白. 为了保证精确性,我们取 5 个点回归,在样品不够时,可在充分预实验的基础上,作 2—3 个点,从而求得 GR_{IR} 扫描值,相对反映 GR_{IR} 的水平.

由于 Mab 所检测的是受体蛋白的免疫活性,这对受体这种极易失活的敏感蛋白来说无疑具有很大的优越性,尤其是对病理情况下受体变化的研究有着重要意义. 受体纯化浓缩后,可以先保存起来待以后检测,也可以把大批标本先纯化制备其浓缩液,然后再集中进行 ELISA 检测. 本法的缺点是只能测定出 GR_{IR} 的相对含量,同时检测的灵敏度也不如放射配体结合法.

关于免疫活性受体的测定,一般采用放射

免疫法,最近朱迅等报导用放免法测定 IL-2 受体就是一例^[13]. 但是放免法的建立需要消耗较多量的 Mab, 还需要有受体的标准品,本方法是在不具备这两个条件的情况下建立的. 鉴于用 Mab 检测受体的工作国内正在起步,多数实验室可能尚不具备上述这两个条件,因此,本方法对国内当前受体的免疫检测研究有一定的参考意义.

本文承蒙张世民和张鲁榕两同志的大力协助,特此致谢.

参 考 文 献

- 1 Okret S *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984; **81**: 1609
- 2 Eisen L P *et al.* *J Biol Chem*, 1985; **260**: 11805
- 3 Eisen H J. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980; **77**: 3893
- 4 徐仁宝等. 科学通报, 1983; (3): 178
- 5 徐仁宝等. 第二军医大学学报, 1981; (3): 161
- 6 裘丽珠等. 上海免疫学杂志, 1988; (2): 118
- 7 Grandics P *et al.* *Endocrinology*, 1982; **111**: 1731
- 8 Westphal H M *et al.* *EMBO J*, 1982; **1**: 1461
- 9 Gametchu B *et al.* *Endocrinology*, 1984; **114**: 274
- 10 Jane T *et al.* *J Pathol*, 1986; **150**: 227
- 11 Robertson N M *et al.* *Biochem J*, 1987; **246**: 55
- 12 杨义力. 生物化学与生物物理进展, 1988; (15): 330
- 13 朱迅等. 中华核医学杂志, 1990; (1): 36

[本文于1990年7月18日收到, 10月22日修回]

(continued from page 451)

As HSPG and DSPG were known to be antiproliferative to arterial smooth muscle cells and of higher binding affinity to plasma low density lipoprotein respectively, the above results might be implicated in the lower prevalence of As in Nanning man and "resistant" co As of dog.

Key words proteoglycan, atherosclerosis, glycosaminoglycan