

Abstract As the expanding of application of ES cell gene targeting technique, cloning and structural analysis of genomic DNA for phage library for homologous fragments in targeting vector are becoming more and more important. An effective strategy has been developed, termed as “separating/combining” strategy, to make restriction mapping of large genomic insert in recombinant phage vector. In this strategy, a set of subclone with commonly used plasmid vector, such as pBluescriptTM series, was generated as

first step, restriction mapping of each subclone was analyzed and then, digested the whole length phage DNA and analyzed the restriction site combined with the mapping of subclones. An accurate restriction mapping of a large insert of a phage clone, which contain mouse coagulation factor IX gene, was generated successfully with this strategy.

Key words restriction mapping, recombinant phage clone, “separating/combining” strategy, gene targeting

单细胞 LDL 受体与清道夫受体活性的同时测定^{*}

边 欣 杨小毅 黄有国¹⁾

(中国科学院生物物理研究所, 生物大分子国家重点实验室, 北京 100101)

摘要 结合应用激光扫描共聚焦显微镜系统 (LSCM) 和 DiI-AcLDL 及 BODIPY FL-LDL 两种荧光配基选择性标记技术, 可在单细胞水平上同时测定 LDL 受体和清道夫受体活性. C57BL/6J 小鼠巨噬细胞用终浓度为 5mg/L 的 DiI-AcLDL 及 BODIPY FL-LDL, 在 37℃ 负载 5 h 左右的条件下可获得良好的标记效果. 两种荧光配基选择性标记具有高度特异性, 在激光共聚焦显微镜下可清晰、定量地观察细胞对 LDL 和 AcLDL 摄入, 是一种灵敏度高且可定量研究 LDL 受体和清道夫受体功能的非同位素方法.

关键词 激光扫描共聚焦显微系统, 荧光选择标记, 低密度脂蛋白受体, 清道夫受体

学科分类号 Q73, Q6-33

生理条件下, 低密度脂蛋白受体 (LDL 受体) 广泛地分布于肝、动脉壁细胞等各组组织细胞膜表面, 当血浆中的 LDL 与其受体结合后, 经受体介导的内吞作用进入细胞中, 并与溶酶体结合. 而 LDL 被摄入量的多少取决于 LDL 受体的活性. 因此 LDL 受体对维持血浆中的 LDL 浓度发挥重要作用. 某些家族性高脂血症患者, 由于 LDL 受体基因遗传性缺损导致细胞不能从血液中摄取 LDL, 使血液中胆固醇水平升高, 从而引发严重的动脉粥样硬化. 另一方面, 体内多种原因都可以导致脂蛋白的修饰, 如血液脂质过氧化物含量增加、内皮细胞的受损和血管平滑肌细胞的增殖, 而巨

噬细胞又可以通过其表面的清道夫受体活跃地吞噬这种修饰后的脂蛋白, 使细胞内大量胆固醇脂聚积成为泡沫细胞^[1], 构成动脉粥样硬化早期最重要的病理变化. 因此, 同时测定 LDL 受体与清道夫受体 (AcLDL 受体) 活性的变化具有重要的生理学和病理学意义. 迄今, 研究 LDL 受体与清道夫受体活性主要是用放射性同位素¹²⁵I 作为示踪剂分别检测群体细胞 LDL 受体与清道夫受体活性^[2]. 近年来, 激光扫描共聚焦显微镜系统 (laser scanning

^{*} 国家自然科学基金资助项目 (39730130).

¹⁾ 通讯联系人.

收稿日期: 1997-12-04, 修回日期: 1998-06-09

confocal microscopy, LSCM) 的使用和专一性的荧光分子探针的问世, 为在单细胞水平上同时测定 LDL 受体与清道夫受体活性提供了可能. 本工作应用 LSCM 技术和 DiI-AcLDL、BODIPY FL-LDL 两种荧光探针选择性标记方法, 在单个巨噬细胞水平上同时测定了 LDL 受体及 AcLDL 受体的活性, 为研究动脉粥样硬化发病的分子机理提供了有效的研究手段.

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

DiI-AcLDL、BODIPY FL-LDL 购自 Molecular Probes 公司; RPMI 1640 培养基购自 Gibco 公司, 新生胎牛血清购自天津血液研究所生化制品厂, 其他试剂均为国产分析纯.

1.2 巨噬细胞培养

C57BL/6J 小鼠 [♂, (20±2) g] 购自中国医学科学院动物试验中心, 向小鼠腹腔注射无血清 RPMI 1640 培养液, 4 d 后断颈处死小鼠, 利用无菌条件下不断冲洗小鼠腹腔的方法获得巨噬细胞, 用含 10% 胎牛血清, 青霉素 100 mg/L, 链霉素 50 mg/L 的 RPMI 1640 培养液在 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 3 d 后, 换液除去不贴壁细胞 (淋巴细胞和肥大细胞), 贴壁细胞即为巨噬细胞, 按实验室常规方法培养 2 d 后进行试验.

1.3 巨噬细胞的荧光染料负载

细胞以 RPMI 1640 培养基调整至密度为

$1 \times 10^7/\text{ml}$, 培养基中含终浓度为 5 mg/L 的 DiI-AcLDL 和 BODIPY FL-LDL, 在 37℃、5% CO₂ 培养箱中孵育 5 h, 其间轻轻振荡几次, 然后以无血清 RPMI 1640 洗 3 次, 以除去未结合的细胞外的荧光探针.

1.4 LDL 受体及清道夫受体的测定

将负载荧光染料的细胞置于 LSCM 样品台上, 利用 LSCM 光镜系统确定欲检测的单个细胞. LSCM 激光扫描共聚焦显微镜系统 (Meridian 公司) 由共聚焦显微镜主体, Argon 激光器和微型计算机构成. 由微型计算机控制调整激光扫描共聚焦显微镜系统软件. 测定时, 选定激发波长为 488 nm, 分别选用 515 nm、575 nm 的滤光片检测发射荧光, 并在显示屏上显示荧光染料在细胞内的分布情况. 激光束的控制以及图象、数据的采集和加工均由计算机完成.

2 结果与讨论

2.1 两种荧光探针的光谱特征

近年来新合成的荧光探针 BODIPY FL-LDL (N-(4, 4-difluoro-5, 7-dimethyl-4-bora-3a, 4a-diazas-indacene-3-pentanol) 和 DiI-AcLDL (1, 1'-diiodo-2, 2', 3, 3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate) 分别是 LDL 受体及 AcLDL 受体 (即清道夫受体) 的特异性荧光配基^[3,4]. BODIPY FL-LDL 及 DiI-AcLDL 的结构式如图 1 所示.

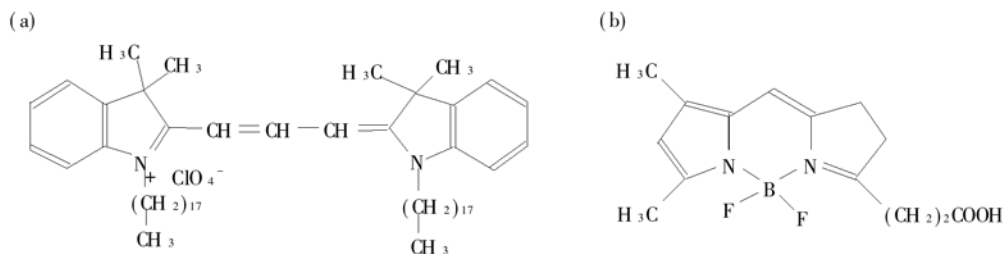


图 1 BODIPY FL- (a) 和 DiI- (b) 的结构式

BODIPY FL- 是一种中性荧光染料, 它结合于 LDL 复合物的疏水性部分. BODIPY FL-

荧光染料对 pH 变化不敏感, 因此, 也可以在溶酶体水平上观察 LDL 的摄入. BODIPY FL-

能很好地被氩激光所激发, 非常适用于激光扫描共聚焦显微镜系统 (LSCM). BODIPY FL-LDL 激发波长为 503 nm, 发射波长为 515 nm; DiI 荧光染料扩散入 AcLDL 中, 但并不改变 AcLDL 的生物活性. DiI-AcLDL 激发波长为 554 nm, 发射波长为 571 nm. 利用具有较为相近激发波长, 但不同发射波长的两种荧光染料对样品进行双标记, 可以在 LSCM 上同时得到两种荧光染料的荧光信号. 在 37℃, BODIPY FL-LDL、DiI-AcLDL 终浓度为 5 mg/L 和细胞负载约 5 h 条件下, 即可获得良好的标记效果. 由于 LDL、AcLDL 是通过细胞膜上特异性受体介导的内吞作用而进入细胞内的, 因此 BODIPY FL-LDL、DiI-AcLDL 进入细胞后不会发生外泄.

2.2 两种受体活性的同时测定

激光扫描共聚焦显微镜系统采用激光扫描原理, 激光光源发出的光在入射光孔处发生会聚, 然后聚焦到样品的某一特定深度即某一特定焦平面上. 其反射光再聚焦经出射光孔至成像平面. 只有某一特定波长的出射光才能为光电倍增管所检测并将信号级联放大. 目前几乎所有的 LSCM 都平行设置一个以上的通道, 荧光被分为两束, 选用不同的滤光片可以在不同波长处对发射荧光进行检测. 以 BODIPY FL-标记 LDL, 以 DiI-标记 AcLDL 并选用 488 nm 激发波长, 双通道分别选用 515 nm、575 nm 的滤光片, 可以在 LSCM 系统清晰地观察到 LDL、AcLDL 被细胞摄入后在细胞内的分布情况 (图 2 见图版 I).

从图 2 左中可以看出在激发波长 488 nm, 检测发射波长 515 nm 条件下, BODIPY FL-LDL 发绿色荧光; 而在激发波长 488 nm, 检测发射波长 575 nm 条件下, DiI-AcLDL 发红色荧光 (图 2 右). 这提示, 在 37℃, C57BL/6J 小鼠巨噬细胞用终浓度为 5 mg/L DiI-AcLDL 和 BODIPY FL-LDL 负载 5 h 左右, 即可获得良好的标记效果. 细胞内的 BODIPY FL-LDL (绿光) 和 DiI-AcLDL (红光) 的激光共聚焦图象说明, 巨噬细胞膜上具有活性的

LDL 受体和清道夫受体的存在, 具有活性的 LDL 受体和清道夫受体可同时摄取 LDL 及 AcLDL 进入细胞内. 由于 BODIPY FL-LDL、DiI-AcLDL 进入细胞的量与细胞膜 LDL 受体及清道夫受体活性成正相关性, 因此, 利用激光扫描共聚焦显微镜系统的微机部分对图象信号 (即荧光强度) 进行处理, 根据荧光强度的变化, 可定量得出巨噬细胞膜上 LDL 受体、清道夫受体的相对转运活性. LDL 受体与清道夫受体活性其总荧光强度 (*FI*) 分别为 1321429、484349. 同时我们还运用该方法测定和比较了巨噬细胞及其泡沫化和凋亡过程中 LDL 受体及清道夫受体活性的变化.

目前体外研究脂蛋白在细胞内的代谢以及脂蛋白受体活性主要应用同位素¹²⁵I 标记的脂蛋白作为示踪剂, 虽然该方法灵敏度高, 但由于放射性同位素对人体非常有害, 并且要求严密的防护措施, 复杂的中间处理步骤以及严格的废物处理过程使同位素标记这一方法繁琐. 而且, 同位素测定的结果只是反映细胞群体的变化, 不能同时了解单细胞 LDL 受体及清道夫受体活性的变化, 更不能反映出 LDL 及 AcLDL 被细胞摄入后在细胞内的分布情况^[5,6]. 本方法由于两种荧光探针的使用并结合 LSCM 技术使得在单细胞水平上同时测定 LDL 受体及清道夫受体活性成为可能. 迄今还没有任何一种方法可以同时测定单细胞 LDL 受体及清道夫受体的活性. 因此, 利用荧光染料 DiI-AcLDL、BODIPY FL-LDL 结合 LSCM 同时测定 LDL 受体及清道夫受体活性的方法明显优于同位素标记的测定方法. 本方法简便易行且灵敏度高, 荧光配基用量可以小到 5 mg/L, 它可用于常规测定不同细胞的脂蛋白受体介导的内吞作用的研究. 这一方法对于研究巨噬细胞泡沫化形成过程中, 单细胞 LDL 受体以及清道夫受体活性的变化提供了一种可行而有效的研究手段, 对于深入探讨动脉粥样硬化发病机理具有重要意义.

参 考 文 献

- 1 Pitas R E, Innerarity T L, Mahley R W. Foam cells in

- explants of atherosclerotic rabbit aortas have receptors for beta very low density lipoproteins and modified low density lipoproteins. *Atherosclerosis*, 1983, **3** (1): 2~ 12
- 2 Bilheimer D W, Ho Y K, Brown M S *et al.* Genetics of the low density lipoproteins receptor. Diminished receptor activity in lymphocytes from heterozygotes with familial hypercholesterolemia. *J Clin Invest*, 1978, **61** (3): 678~ 696
- 3 Voyta J C, Via D P, Butterfield C E *et al.* Identification and isolation of endothelial cells based on their increased uptake of acetylated low density lipoprotein. *J Cell Biol*, 1984, **99** (6): 2034~ 40
- 4 Bennett M W, Caulfield J P. Specific binding of human low-density lipoprotein to the surface of schistosomula of *Schistosoma mansoni* and ingestion by the parasite. *Am J Pathol*, 1991, **138** (5): 1173~ 82
- 5 Pitas R E. Expression of the acetyl low density lipoprotein receptor by rabbit fibroblasts and smooth muscle cells. Up-regulation by phorbol esters. *J Biol Chem*, 1990, **265** (21): 12722~ 7
- 6 Teupser D, Thierry J, Walli A K *et al.* Determination of LDL and scavenger receptor activity in adherent and non-adherent cultured cells with a new single-step fluorometric assay. *Biochim Biophys Acta*, 1996, **1303** (3): 193~ 198

Simultaneous Determination of LDL and Scavenger-receptor Activity in a Single Macrophage. BIAN Xin, YANG Xiao-yi, HUANG You-guo (*National Laboratory of Biomacromolecules, Institute of Biophysics,*

The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China).

Abstract By combination of laser scanning confocal microscopy (LSCM) and the highly sensitive fluorescent dyes BODIPY FL-LDL and DiI-AcLDL, it is possible that activities of both LDL and scavenger receptors in a single cell can be measured simultaneously and quantitatively. For example, in C57BL/6J macrophage, it was found that the cells were incubated for 5 h at 37 °C with 5 mg/L DiI-AcLDL and 5 mg/L BODIPY FL-LDL resulted in excellent color imaging under LSCM, the LDL receptor with green and scavenger receptor with red. The high selectivity and visualization of this method provide detailed information on the localization and activity of both receptors in a single macrophage. The rapidity and accuracy of this assay allows its application for studying receptor-mediated lipoprotein uptake.

Key words laser scanning confocal microscopy (LSCM), fluorescence selective labelling, low density lipoprotein receptor, scavenger receptor

乳酸脱氢酶与酯酶同工酶同板染色法

余来宁 方耀林 姚雁鸿 许映芳

(长江水产研究所, 农业部淡水鱼类种质资源与生物技术重点实验室, 荆州 434000)

摘要 介绍一种在同一块凝胶板上染乳酸脱氢酶 (LDH) 与酯酶 (EST) 的染色方法. 该同板染色法利用两种同工酶显色反应互不干扰和颜色不同的特点, 先染 LDH, 后染 EST, 可以在同一块胶板上得到两种同工酶清晰的酶带, 每一种酶的酶带与单板染色的酶带完全一样. 这种染色法, 能节省同工酶分析所需的试剂、时间和经费, 也便于样品的鉴定与比较, 是一种经济有效的方法. 此方法, 同样适用于苹果酸脱氢酶 (MDH) 与酯酶等同工酶的同板染色.

关键词 乳酸脱氢酶, 酯酶, 同工酶, 同板染色

学科分类号 Q55

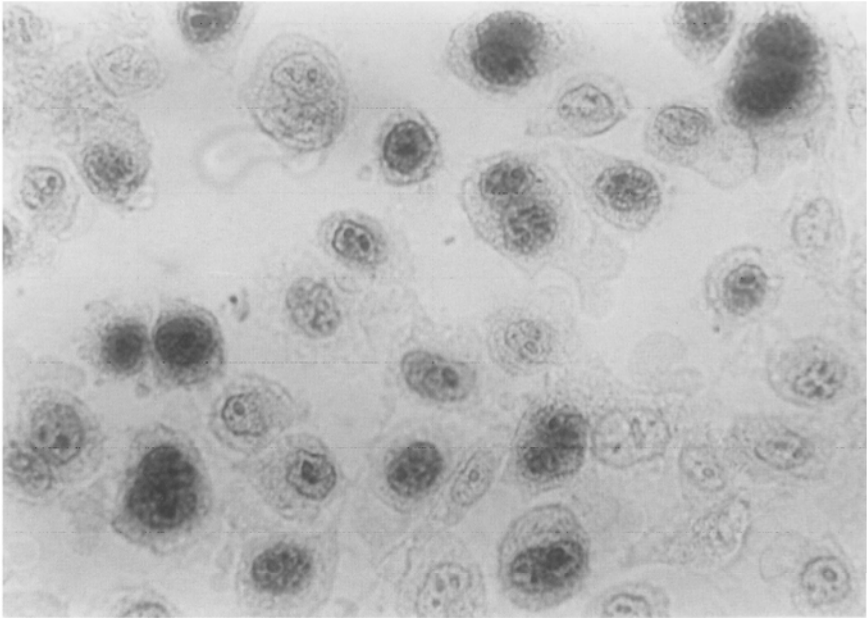


图 4 AdCMVLacZ 病毒感染 HeLa 细胞(M.O.I. = 10, × 66)

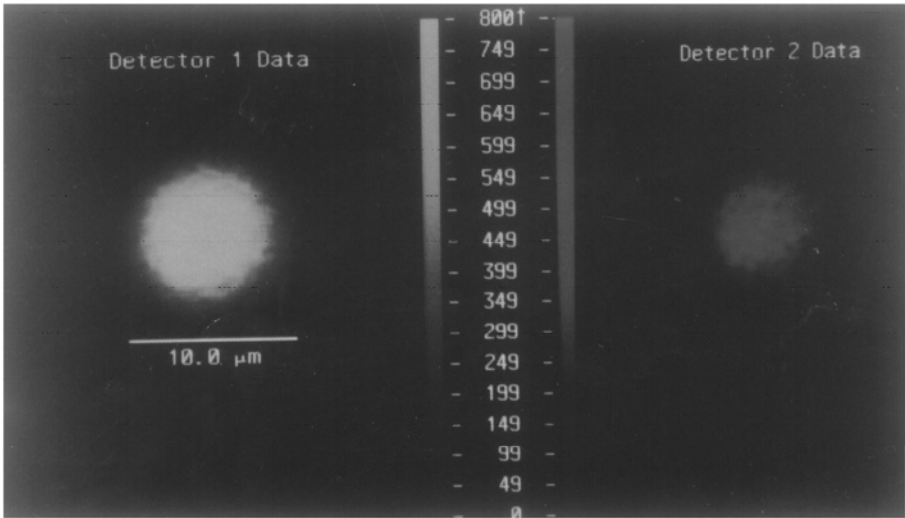


图 2 BODIPY FL-LDL、DiI-AcLDL 在单细胞内的分布