

# 兔肝细胞膜高密度脂蛋白受体 酶联免疫检测法的研究\*

纪延<sup>1)</sup> 傅明德<sup>2)</sup> 吴新伟 刘秉文

(华西医科大学载脂蛋白研究室, 成都 610041)

**摘要** 用辣根过氧化物酶标记羊抗人 apoA-IgG, 建立了检测兔肝细胞膜 HDL 受体的酶联免疫吸附检测法. 测定时, HDL 结合量按抗体-配体-抗配体抗体酶交联物反应制作的标准曲线确定; 膜蛋白非特异吸附则用与酶交联的抗体来源相同的同种动物血浆 HDL 平行抑制试验消除. 实验测得正常家兔肝细胞膜 HDL 受体  $K_d$  值为  $7.17 \pm 1.18$  mg/L,  $B_{max}$  值为  $(622.5 \pm 146.1)$  mg/g ( $n = 7$ ).

**关键词** HDL 受体, 肝细胞膜, 酶联免疫测定法

**学科分类号** R363

研究发现, 肝细胞和周围组织细胞的细胞膜上存在可特异结合 HDL 的受体<sup>[1,2]</sup>. 它们在胆固醇逆向转运 (reverse cholesterol transport, RCT) 的过程中起着重要作用. 建立不影响 HDL 与 HDL 受体发生生物学结合反应的抗配体抗体酶联免疫受体分析法 (enzyme-linked immunosorbent receptor assay, ELIRA)<sup>[3]</sup>, 深入研究肝细胞膜 HDL 受体, 对于阐明 RCT 的分子基础及动脉粥样硬化 (As) 的发病机理具有重要意义.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

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; 辣根过氧化物酶 (HRP, RZ= 3.0), Sigma 公司产品; 羊抗人 apoA-IgG 由本实验室制备.

肝细胞膜及抗 apoA-IgG 包被缓冲液为 pH 9.6, 50 mmol/L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ - $\text{NaHCO}_3$  缓冲液; 洗涤及稀释缓冲液为 pH 7.4, 含 0.1% 吐温 20 的 20 mmol/L PBS; 封闭缓冲液为含 1% BSA 的 pH 9.6, 50 mmol/L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ - $\text{NaHCO}_3$  缓冲液; 受体结合介质为 pH 7.5, 0.05 mmol/L Tris-HCl 缓冲液. 酶反应基质液为 pH 6.5, 含 0.04% 邻苯二胺、0.15%  $\text{H}_2\text{O}_2$  的 0.1 mol/L 柠檬酸- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  缓冲液 (邻用前配制).

### 1.2 兔肝细胞膜的分离纯化

按蔗糖密度梯度超速离心法<sup>[4]</sup>纯化兔肝细胞膜. 膜产率为每克湿肝组织产 1.5~ 2.0 mg, 与肝匀浆相比, 纯化兔肝细胞膜 5'-核苷酸酶活力提高 6~ 10 倍.

### 1.3 血浆脂蛋白及无 apoE-HDL<sub>3</sub> 的制备

按一次性密度梯度超速离心法<sup>[5]</sup>分离人血浆及山羊血浆脂蛋白. 收集  $d = 1.030 \sim 1.050$  g/ml 的 LDL 组分,  $d = 1.120 \sim 1.175$  g/ml 的 HDL<sub>3</sub> 组分及  $d = 0.95 \sim 1.006$  g/ml 的 VLDL 组分.

人血浆无 apoE-HDL<sub>3</sub> 参照 Weisgraber 等<sup>[6]</sup>的方法制备.

膜蛋白及脂蛋白均按 Markwell 等<sup>[7]</sup>的方法测定蛋白质含量.

### 1.4 HRP-羊抗人 apoA-IgG 交联物的制备

按过碘酸钠法<sup>[8]</sup>制备.

### 1.5 HDL 受体结合实验

按抗配体抗体酶联免疫测定法<sup>[3]</sup>进行.

**1.5.1 膜蛋白吸附量的确定:** 将包被过夜后的酶标板各孔中膜蛋白液全部吸出, 分别测定各孔吸出液及包被原液的蛋白量, 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  $(0.550 \pm 0.034)$   $\mu\text{g}$  ( $n = 50$ , 每板测定 10 孔, 测定 5 板).

**1.5.2 抗 apoA-IgG 包被浓度及酶联抗体稀释度的确定:** 选择对倍稀释的抗 apoA-IgG (50, 25, 12.5, 6.25 mg/L) 及 HRP-抗 apoA-IgG (1: 125, 1: 250, 1: 500, 1: 1000 稀释度) 进行棋盘滴定, 确定抗 apoA-IgG 的饱和包被浓度及 HRP-抗 apoA-IgG 的工作浓度.

**1.5.3 膜蛋白包被浓度的确定:** 选择对倍稀释的膜蛋白 (50, 25, 12.5, 6.25 mg/L) 包被酶标板,

\* 国家教委博士学科点专项科研基金资助.

<sup>1)</sup> 现在美国 Toledo 大学攻读博士学位.

<sup>2)</sup> 通讯联系人.

收稿日期: 1998-07-10, 修回日期: 1998-10-19

在上述棋盘滴定确定的 HRP-抗 apoA1-IgG 的工作浓度下确定膜蛋白饱和包被浓度。

**1.5.4 HDL 结合量的标准曲线:** 采用双抗体夹心法, 以上述抗 apoA1-IgG 与 HRP-抗 apoA1-IgG 棋盘滴定确定的抗 apoA1-IgG 的饱和包被浓度及 HRP-抗 apoA1-IgG 的工作浓度绘制人血浆 HDL 结合量 (200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25 ng) 的标准曲线。

**1.5.5 HDL 受体结合活性的测定:** 按棋盘滴定确定的 HRP-抗 apoA1-IgG 的工作浓度及膜蛋白饱和包被浓度进行。其中非特异结合通过同时加入过量 25 倍的与抗 apoA1-IgG 同种动物 (山羊) 血浆 HDL 的平行试验确定。结合到膜受体上的 HDL 量由测定的 492 nm 处光吸收值查 HDL 结合量的标准曲线确定, 标准曲线与受体活性测定在同一酶标板内完成, 测定值为三孔平均值。

## 2 结 果

### 2.1 抗 apoA1-IgG 与 HRP-抗 apoA1-IgG 棋盘滴定

结果发现酶显色的光吸收值随抗 apoA1-IgG 及酶联抗体的浓度增加, 呈可饱和的矩形双曲线。当抗 apoA1-IgG 浓度为 25 mg/L, HRP-抗 apoA1-IgG 稀释度为 1:250 时, 光吸收值即可达到最大, 选择此条件作为抗体包被及酶-抗体交联物的工作浓度。

### 2.2 膜蛋白包被浓度的确定

测定发现酶显色的光吸收值随包被膜蛋白量增加也呈可饱和的矩形双曲线。当膜蛋白浓度为 25 mg/L 时, 光吸收值即可达到最大, 选择此条件进行受体结合活性测定。

### 2.3 HDL 结合量的标准曲线

由图 1 可见, 测定光吸收值与每孔加入 HDL 蛋白含量在 0~200 ng 范围内呈直线关系 ( $r = 0.996$ )。

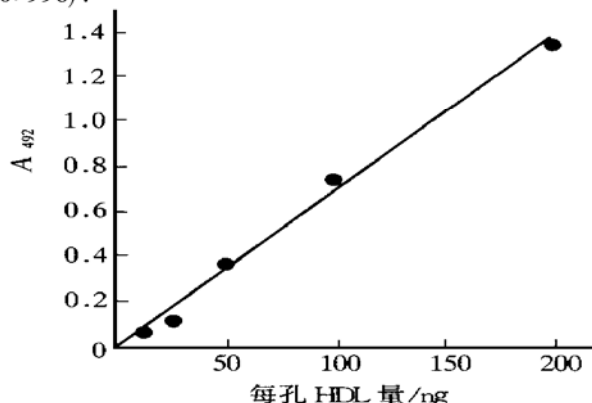


图 1 HDL 结合量的标准曲线

### 2.4 肝细胞膜 HDL 受体的结合特性

**2.4.1 受体结合的特异性:** 用过量不同倍数的与酶联抗体来源一致的同种动物 (山羊) 血浆 HDL 及人血浆 LDL、VLDL 及 BSA 进行兔肝细胞膜 HDL 受体竞争结合试验 (图 2), 山羊血浆 HDL 过量 3 倍即可抑制人血浆 HDL 与兔肝细胞膜 HDL 受体结合的 50%, 过量 20 倍可抑制 90% 以上, 而 LDL、VLDL 及 BSA 则不表现抑制作用。

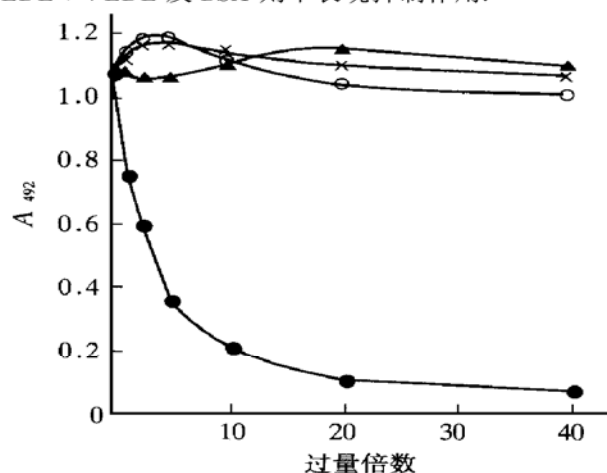


图 2 山羊血浆 HDL 的竞争性抑制试验

●—●: 山羊 HDL; ○—○: 人 LDL; ▲—▲: 人 VLDL; ×—×: BSA.

**2.4.2 受体饱和曲线及 Scatchard 作图分析:** HDL 的特异性结合量随加入的 HDL 蛋白浓度增加而增加, 呈可饱和趋势 (图 3a)。Scatchard 作图呈直线,  $r = -0.982$ , 解离常数  $K_d$  为  $(7.17 \pm 1.18)$  mg/L, 最大结合容量  $B_{max}$  为  $(622.5 \pm 146.1)$  mg/g 膜蛋白 (正常家兔  $n = 7$ ) (图 3b)。

**2.4.3  $Ca^{2+}$  及 EDTA 对受体结合特性的影响:** 于反应系统中加入 0~5 mmol/L  $CaCl_2$  及 0~30 mmol/L  $EDTA_{Na_2}$ , 12.5 mg/L HDL 与肝细胞膜受体的结合与不加  $CaCl_2$  和  $EDTA_{Na_2}$  的对照组比较未发现显著性差异, 说明 HDL 与肝细胞膜 HDL 受体的结合不依赖于  $Ca^{2+}$ , 不受  $EDTA_{Na_2}$  抑制。

### 2.5 重复性试验

取同一家兔肝细胞膜同时包被 5 块酶标板, 分别测定其 HDL 最大结合量。测得的最大结合量为  $(462.4 \pm 22.9)$  mg/g 膜蛋白 ( $n = 5$ ), 范围为 435.2~497.2 mg/g 膜蛋白, 变异系数为 5.0%。

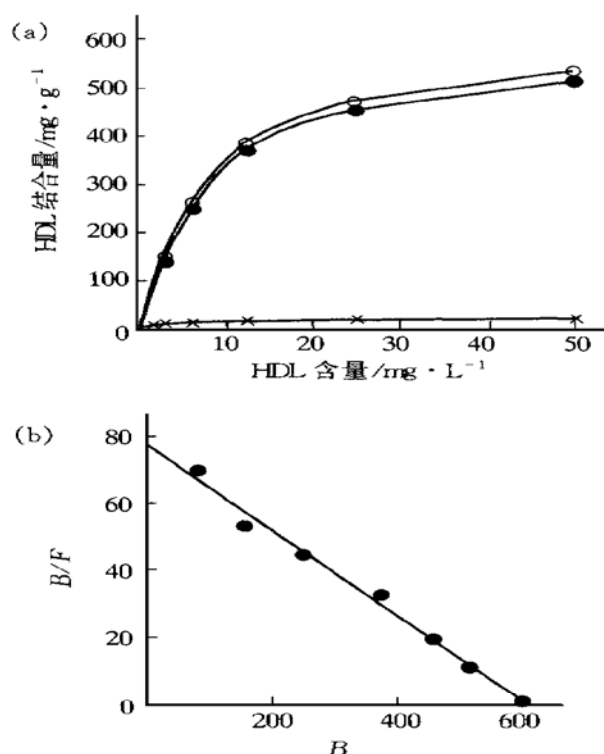


图3 兔肝细胞膜 HDL 受体饱和曲线

(a) 饱和曲线; ○—○: 总结合; ●—●: 特异结合;  
×—×: 非特异结合。(b) Scatchard 作图。

### 3 讨 论

本文建立了一种检测肝细胞膜高密度脂蛋白受体的抗配体抗体酶联免疫测定法。不含 apoE 的 HDL 与吸附在酶标板上的肝细胞膜 HDL 受体发生生物学结合, 再与 HRP-抗 apoA1-IgG 发生免疫学结合, 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 HDL 受体活性。

用抗 apoA1-IgG 包板, 按双抗体夹心法制作标准曲线, 可用于求测膜 HDL 受体所结合的 HDL 蛋白量。当加入的 HDL 很少时, 抗体-抗原呈零级反应<sup>[9]</sup>, 因此, 制作标准曲线时, 加入的抗原量即可代表固相抗 apoA1-IgG 的 HDL 结合量。

为确定酶联抗体工作浓度及抗体、膜蛋白饱和包被浓度, 我们进行了抗 apoA1-IgG 与 HRP-抗 apoA1-IgG 的棋盘滴定以及膜蛋白包被浓度的滴定。首先, 在抗 apoA1-IgG 饱和包被浓度下, 选择可使固相酶复合物发挥最大催化活性的最高 HRP-抗 apoA1-IgG 稀释度为酶联抗体的工作浓度。然后, 再由该酶联抗体的工作浓度确定膜蛋白饱和包被浓度。由于同一酶标板上进行的受体结合试验和 HDL 结合量标准曲线试验的条件完全一致, 因此, 根据固相受体结合的酶的显色反应光吸收值, 可直

接查得肝细胞膜 HDL 受体的 HDL 结合量。

此外, 酶标板上受体蛋白吸附量由包被前后膜蛋白浓度的差值计算确定; 膜蛋白非特异结合通过用可与膜受体发生生物学结合, 但不能与 HRP-抗 apoA1-IgG 发生免疫学结合的同种动物 (山羊) 血浆 HDL 的平行试验消除, 经竞争性抑制试验证实, 该法简便可行; 同时, 本法采用酶-抗 apoA1-IgG 交联物避免了 HDL 因与酶直接交联造成的生物学活性的改变, 能反映受体配体的真实结合特性。本法测定灵敏度高, 重复性好, 不需特殊设备, 而且可以广泛用于人及其他动物细胞及细胞膜 HDL 受体的测定, 因此在脂质代谢及心血管疾病的研究上具有广泛的应用价值。

### 参 考 文 献

- 1 Chacko G K. Human high density lipoprotein (HDL<sub>3</sub>) binding to rat liver plasma membranes. *Biochim Biophys Acta*, 1982, **712** (1): 129~141
- 2 Biesbroeck R, Oram J F, Albers J J, *et al.* Specific high-affinity binding of high density lipoproteins to cultured human skin fibroblasts and arterial smooth muscle cells. *J Clin Invest*, 1983, **74** (2): 525~539
- 3 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 (Fu M D. Method of enzyme receptor assay. In: Cao Z Y ed. *Hormone Receptor and Clinical Application*. Beijing: United Publication House of Beijing University of Medical Sciences & Chinese Union University of Medical Sciences), 1993. 169~176
- 4 Ray T K. A Modified method of the isolation of the plasma membrane from rat liver. *Biochim Biophys Acta*, 1970, **196**(1): 1~9
- 5 张林华, 刘秉文 (Zhang L H, Liu B W). 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学报 (Acta Biochem Biophys Sinica)*, 1989, **21** (3): 257~260
- 6 Weisgraber K H, Mahley R W. Subfractionation of human high density lipoproteins by heparin-sepharose affinity chromatography. *J Lipid Res*, 1980; **21** (2): 316~325
- 7 Markwell M K, Hass S M, Bieber L L, *et al.* A modification of lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem*, 1978, **87** (1): 206~210
- 8 郭春祥, 郭锡琼 (Guo C X, Guo X Q). 介绍一种简单、快速、高效的辣根过氧化物酶标记的过碘酸钠法. *上海免疫学杂志 (Shanghai J Immunol)*, 1983, **3** (1): 97~100
- 9 Karen M, Kraemer F B, Chen J, *et al.* ELISA measurement of LDL receptors. *J Lipid Res*, 1990, **31** (6): 1683~1690

**Study on the Enzyme linked Immunosorbent Receptor Assay of High Density Lipoprotein Receptors on Liver Plasma Membranes.** JI Yan, FU Ming-De, WU Xir-Wei, LIU Bing-Wen (*Laboratory of Apolipoprotein, West China University of Medical Sciences, Chengdu 610041, China*).

**Abstract** Using HRP-conjugated goat anti-human apoA1-IgG, an enzyme-linked immunosorbent receptor assay was developed for measurement of high density lipoprotein (HDL) receptors on rabbit liver

plasma membranes. A curve of anti apoA1-IgG binding to known amounts of HDL was constructed to quantify the HDL bound. Parallel samples with 25-fold excess goat plasma HDL were assayed to detect nonspecific binding. The results showed that the  $K_d$

and  $B_{max}$  of rabbit liver plasma membrane HDL receptors were  $(7.17 \pm 1.18)$  mg/L and  $(622.5 \pm 146.1)$  mg/L respectively ( $n=7$ ).

**Key words** HDL receptor, liver plasma membrane, enzyme-linked immunosorbent receptor assay

## 一个新的鼠 STE20 家族激酶的克隆和鉴定

姜勇<sup>1)</sup> 韩家淮<sup>2)</sup> 顾军<sup>3)</sup>

(第一军医大学病理生理教研室和全军休克微循环重点实验室, 广州 510515)

**摘要** 从鼠肝 cDNA 文库克隆了一个新的 STE20 类蛋白激酶, Mess1. 其 cDNA 长 1.7 kb, 编码了一个 497 个氨基酸残基的多肽, 与人 MST2 具有 95% 的氨基酸相同. Mess1 蛋白氨基末端激酶催化区的序列与 STE20 同源, 其羧基末端包含了一簇丝氨酸/苏氨酸和谷氨酸丰富的序列, 被认为具有介导与 SH2 功能区结合的作用. MESS1 可能通过与含有 SH2 功能区的蛋白质相互作用参与细胞内信号转导.

**关键词** STE20, 蛋白激酶, 丝裂原活化蛋白激酶, 信号转导

**学科分类号** Q228

蛋白激酶是生物酶的一个大家族, 在真核细胞介导对外界刺激的反应中起着重要的作用<sup>[1,2]</sup>. 丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 介导了细胞生长、分化、细胞周期、凋亡和应激反应等多种细胞过程<sup>[1,2]</sup>. MAPK 级联的核心部分是一个由 MKKK (MAP kinase kinase kinase)、MKK (MAP kinase kinase) 和 MAPK 三个成分构成的模型<sup>[1,2]</sup>. 从酵母菌 (*S. cerevisiae*) 到哺乳动物 MAPK 的三级激酶级联非常保守. 绝育 20 (sterile twenty, STE20) 是从酵母菌克隆的一个丝氨酸/苏氨酸激酶, 位于交配信息传导通路典型的 MAPK 级联模型的上游<sup>[3]</sup>. 蛋白激酶催化功能区高度保守, 其同源性已被成功地用于多个激酶家族新成员的鉴定. 本文报道用简并 PCR 技术克隆一个新的鼠 STE20 家族的蛋白激酶.

### 1 材料和方法

#### 1.1 cDNA 克隆和序列分析

p21 激活蛋白激酶 (p21 activated protein kinase, PAK) 是一个低分子质量 GTP 酶, 属于 STE20 家族成员<sup>[4]</sup>. 为了分离与 PAK 相关的新基因, 选用了编码蛋白激酶第 VII 和 VIII 催化亚区的 cDNA 序列来合成寡核苷酸引物. 简并寡核苷酸引物的序列是 5' GT (A/G/T/C) AA (A/G) (TC) T (A/G/T/C) AC (A/G/T/C) GA (T/C) TT (T/C) GG3' 和 5' TA (A/G/T/C) GG (A/G/T/

C) AG (A/G/T/C) GACCADAT (A/G) TC3'. 用这两个引物从鼠前 B 细胞系 70Z/3 的 mRNA 扩增 cDNA 片段. 扩增出的片段长度符合预期长度, 约 150 bp. 该片段分离后克隆到 TA 克隆载体 pT7Blue (R) (Novagen, Madison, WI). 选出 9 个克隆测序. 使用 BLAST 程序搜索 GenBank<sup>TM</sup> 数据库, 发现其中一个克隆编码了一个新的 PAK 相关激酶的功能区片段.

使用随机引物标记方法, 从该 150 bp 片段合成 ( $\gamma$ -<sup>32</sup>P) 标记的探针. 用该探针筛选鼠肝 cDNA 文库 (Clontech, Palo, Alto, CA). 重组菌斑铺在 150 mm 培养皿上, 密度为 30 000 pfu/皿. 在杂交缓冲液 ( $6 \times$  SSC;  $2 \times$  Denhardt's, 1% SDS 和 0.1 g/L 热变性鱼精 DNA) 60℃ 过夜完成杂交反应. 然后, 用  $1 \times$  SSC (150 mmol/L NaCl, 10 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mmol/L EDTA, pH 7.2) 65℃ 漂洗<sup>[5,6]</sup>. 经过筛选  $5 \times 10^5$  克隆后, 得到 4 个阳性克隆, 包含有 0.4~1.7 kb 的插入片段. 最长 1.7 kb 的 cDNA 分离后做全序列分析. 发现这个克隆的序列是一个新的 PAK 同源物, 我们称之为 Mess1.

#### 1.2 cDNA 构建和蛋白表达

以克隆在 pBluescript 的全长 Mess1 作为模板进

<sup>1)</sup> 通讯联系人.

<sup>2)</sup> Department of Immunology, The Scripps Research Institute, 10550 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037, USA.

<sup>3)</sup> 中山医科大学分子医学研究中心, 广州 510089.

收稿日期: 1998-08-08, 修回日期: 1998-12-18