论著

文章编号:1000-5404(2009)09-0822-03

一种高效FITC标记LPS方法的建立及应用

李宇宁,曹红卫,郑 江,刘 鑫,鲁永玲,王艳艳 (第三军医大学西南医院综合实验研究中心,重庆 400038)

摘 要:目的 探索一种高效的荧光素示踪内毒素(lipopolysaccharide,LPS)的方法。**方法** 将LPS解聚为单体后,加入表面活性剂,在37 ℃中性溶液中用FITC标记LPS 18 h,通过分子截留技术将小分子游离的FITC及其他杂质从FITC-LPS中除去,并用荧光分光光度计分别测定标记反应液和纯化后的FITC-LPS溶液的荧光值,将两者进行比较,测定荧光标记率。**结果** 本方法标记的FITC-LPS在激光共聚焦显微镜下能进行良好示踪。经荧光分光光度计检测其标记率为LPS:FITC=1:33.13(物质的量比值)。**结论** 利用表面活性剂与超滤纯化相结合对LPS进行FITC标记的方法较传统方法效率高,操作简单可靠,为医药学实验中示踪LPS提供了一条有效的途径。

关键词: 内毒素;FITC;标记方法

中图法分类号: Q5-33; Q539 **文献标识码:** A

Labeling of lipopolysaccharide with fluorescein isothiocyanate and its application

LI Yu-ning, CAO Hong-wei, ZHENG Jiang, LIU Xin, LU Yong-ling, WANG Yan-yan (Medical Research Centre, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To set up a more effective fluorescein labeling method to trace lipopolysaccharide (LPS). **Methods** LPS was disaggregated into monomers and then a surface activator was added, followed by labeled with fluorescein isothiocyanate (FITC) in the neutral solution at 37℃ for 18 h. The FITC-LPS was further purified by using a Ultra-4 millipore filter. By examination of spectrophotometer, a comparative analysis of labeling efficiency was performed between the purified solution and the raw solution. The tracing efficiency of our FITC-labeled LPS was compared with that of the 2 commercial products by laser confocal electron microscopy. **Results** The end product of FITC-LPS was detected effectively under confocal microscope, expressing fine tagging ability. This new method had a labeling rate of FITC to LPS ratio (33.13∶1) than the traditional method does. **Conclusion** The new method combining the surface activator and ultra-filter shows a higher FITC-LPS labeling efficiency, and can be used to trace LPS in experimental research.

Key words: lipopolysaccharide; fluorescein isothiocyanate; labeling method

内毒素(lipopolysaccharide,LPS)是革兰阴性细菌细胞外膜的组成成分。LPS作为重要的病原体相关分子模式,其诱导脓毒症发生的能力最强,在脓毒症的病理生理过程中发挥着重要的作用[1]。LPS与炎症反应细胞膜上的模式识别受体TLR4结合,介导炎症细胞活化,释放炎症介质而引发机体的炎症反应。LPS与受体TLR4的结合及其在细胞中的分布状态是研究LPS致病机制的重要研究手段之一。越来越多的实验研究需要对LPS进行标记示踪,而商品化荧光标记的LPS在本课题组前期研究和国内众多科研单位的应用回馈中效果均很不理想。故本研究旨在探讨一种确切有效的LPS荧光标记方法,以解决LPS介导炎症反应相关课题研究中示踪LPS的迫切问题。

1 材料与方法

1.1 仪器与材料

RAW264.7细胞,LPS(O55∶B5,Sigma),FITC荧光素(Sigma),FITC-LPS(O55∶B5,Lot F8666,Sigma),Alexa Fluor® -LPS(O55∶B5,Lot 50108A,Invitrogen),表面活性剂脱氧胆酸钠(SCRC国药集团),Ultra-4超滤离心管(Millipore),电子pH计(Mettler Toledo),F-2500荧光分光光度计(Hitachi),Eppendorf Centrifuge 5804R离心机,Varioskan Flash连续光谱测读仪(Electron corporation),激光共聚焦电子显微镜。

1.2 实验方法

1.2.1 FITC标记LPS 参考Triantafilou等[2,3]提供的标记方法,将4 mg LPS加入到2 ml 0.5 %的三乙胺溶液内,于0 ℃环境中振荡30 min,使LPS多聚体解离成单体;再加入200 μl

基金项目:国家自然科学基金面上项目(30872681)
Supported by the General Program of the National Natural Science Foundation of China (30872681)

作者简介:李宇宁,女,湖南省长沙市人,硕士研究生,主要从事脓毒症防治方面的研究。E-mail: saintlyal@163.com

通信作者:郑 江,电话:(023)68754435,E-mail: zhengj@mail.tmmu.com.cn

收稿日期:2008-11-13;修回日期:2009-02-17

100 mmol/L 的 EDTA 溶液,并用 10 μl 1 mol/L 的 HCl 将溶液体系的 pH 调节为 5;用 800 μl 0.25 mol/L 的 PBS 缓冲液(pH 9.5)将 20 mg FITC 溶解,然后加入前面 LPS 的混合溶液中,振荡混匀;最终的标记混合溶液体系中,加入 1 ml 1.6 % 的表面活性剂脱氧胆酸钠[4] 抑制单体聚合成多聚体,最后在 37 ℃环境中振荡 18 h 使 FITC 标记到单体 LPS 上。

1.2.2　FITC-LPS 分离提纯与标记率测定　　将总体积 4 ml 的 FITC-LPS 标记初始液先取出微量进行倍比稀释,检测其初始荧光强度值,然后全部加入到 Ultra-4 超滤离心管(截留相对分子质量 3 000)中,转速 4 500 × *g* 离心 35 min。1 次离心结束后,超滤离心管筛槽内剩余标记液的体积约为 0.5 ml,收集管底滤出液倍比稀释后使用分光光度计检测荧光,再将筛槽内标记液用超纯水补充到 4 ml,混匀,重复离心 35 min。反复离心(共 12 次)直到超滤离心管底的滤出液检测不出荧光值。

最终测定 Ultra-4 超滤离心管筛槽内的 FITC-LPS 标记终液的荧光强度及 12 次离心洗涤滤出液混合后的荧光强度。两者均与标记初始液的荧光强度进行对比,计算荧光标记率。

1.2.3　激光共聚焦观察 FITC-LPS 示踪效果并与商品化试剂对比　　24 孔板培养 RAW264.7 细胞使之贴壁爬片,每孔体积 500 μl,细胞数量(1 ~ 5) × 10^5,培养 16 h 后更换细胞培养液并加入荧光标记 LPS。共设 3 组细胞,每组 4 孔,第 1 组加入梯度浓度的自标 FITC-LPS(100、200、400、800 ng/ml),第 2 组加入同梯度浓度的商品化 FITC-LPS(Sigma),第 3 组加入同梯度浓度的 Alexa Fluor® -LPS(Invitrogen)。37 ℃环境刺激 30 min 后清洗爬片,利用激光共聚焦显微镜进行荧光检测。

2　结果

2.1　离心纯化结果

使用超滤离心管重复离心洗涤 12 次之后,滤出液各倍比稀释浓度在分光光度计下检测无荧光,标志游离荧光素已去除干净。

标记初始液中 FITC 的量为 20 mg,将逐次洗涤液的荧光值与标记初始液的荧光值进行比较,可以换算出每次洗下的 FITC 的量,制作面积曲线图(图 1),即可显示洗脱趋势。

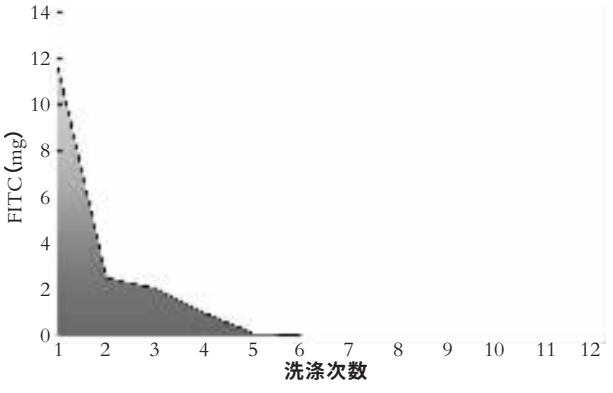


图 1　游离 FITC 洗脱量趋势图

2.2　标记率测定

标记终液用 F-2500 荧光分光光度计测量光密度值(激发波长 490,检测波长 588 nm)作为荧光值,与同样方法测量的标记初始液进行对比,计算每组稀释浓度的终液和初始液的荧光比,比值即为标记结合的 FITC 量/总反应 FITC 的量。结果如表 1 所示。

表 1　初始液总荧光检测和最终标记液的荧光值检测对比

稀释倍数	标记初始液	标记终液	终液/初始液(比值)
80	2 554.0	676.2	0.30
160	2 160.0	563.7	0.26
320	1 581.0	391.5	0.25
640	967.0	209.1	0.22
1 280	388.1	100.0	0.26
2 560	206.7	53.9	0.26

为进一步证明标记效率结果的可靠和精确性,设置辅助实验,利用 Varioskan Flash 连续光谱测读仪测量 12 次离心洗涤的总滤出液和标记初始液的荧光值,如表 2 所示。计算每组稀释浓度的总滤出液和初始液的荧光比,比值即为未标记的 FITC 量/总反应 FITC 的量。

表 2　初始液总荧光检测和最终洗涤滤出液的荧光检测对比

稀释倍数	标记初始液	总滤出液	滤出液/初始液(比值)
80	83.87	59.55	0.71
160	39.32	27.58	0.70
320	18.94	14.58	0.77
640	9.72	7.73	0.80
1280	4.82	3.48	0.72
2560	2.93	1.87	0.64

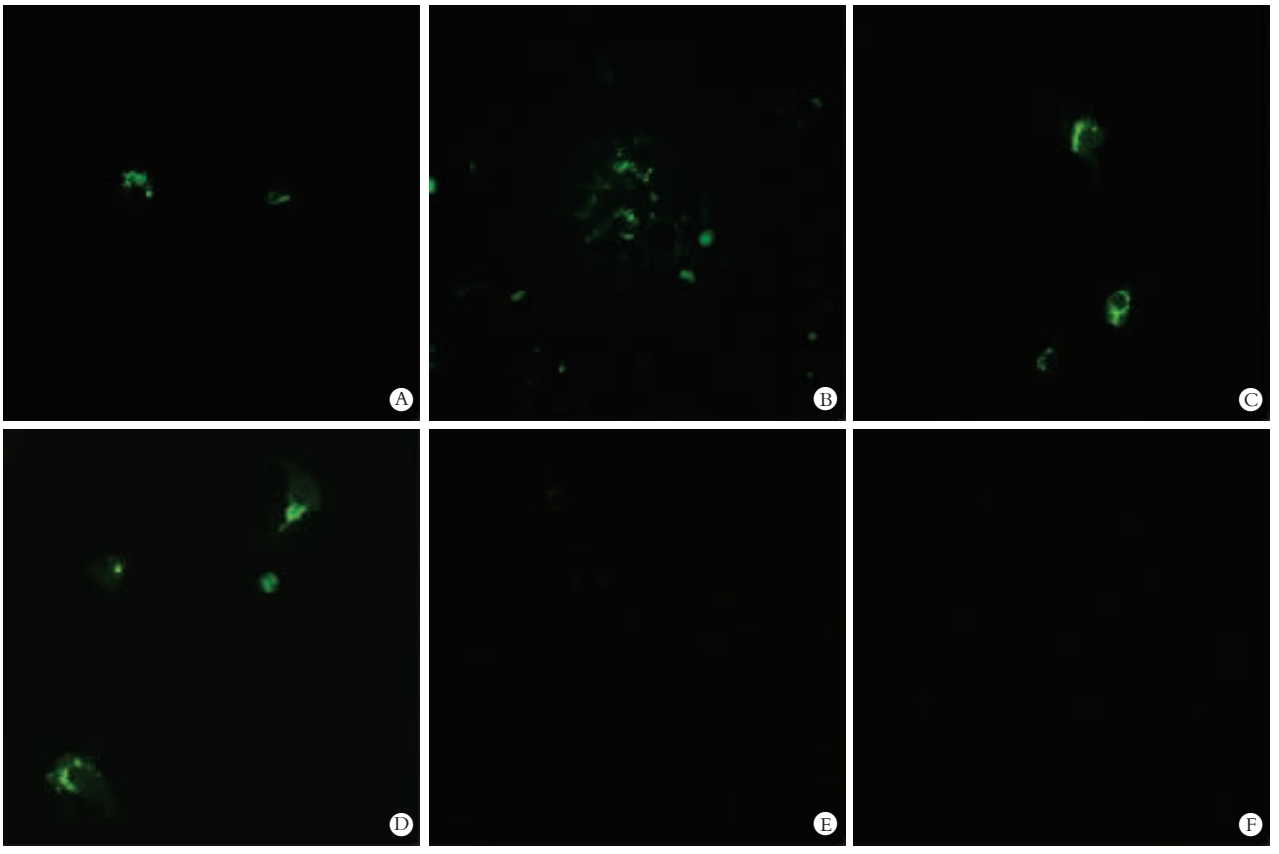
由以上 2 个实验对照可得:平均标记上的 FITC 百分比为 25.8%,平均未标记的 FITC 百分比为 72.3%。2 种不同的检测方法、不同检测仪器得到的标记率结果得到吻合,显示此标记方法操作损耗不到 2%。即实际标记上的荧光素量为 20 mg × 0.258 = 5.16 mg,每毫克 LPS 上标记的 FITC 为 1.29 mg。因 LPS 平均分子量为 10 000,FITC 平均分子量为 389.38,故换算为物质的量比则为 1 mol LPS 标记了 FITC 33.13 mol。

2.3　激光共聚焦下观察标记效果

激光针孔开为 100 nm。FITC 绿色荧光通道,激发波长为 488 nm;Alexa Fluor 红色荧光通道,激发波长为 548 nm。结果如图 2 可见,各 FITC-LPS 梯度浓度下,自标 FITC-LPS 荧光示踪效果均明显好于 2 种商品化荧光标记 LPS。

3　讨论

LPS 是一种主要的病原分子,在介导脓毒症发病中起着重要作用,明确 LPS 与机体的相互作用有助于深入理解脓毒症的发病机制。因此有关 LPS 的致病机制研究一直是医药学界普遍关注的热点[5]。研究 LPS 生物学活性的一种重要方法是通过示踪 LPS,观察其与相应受体的相互作用及在细胞内的分布状态。本课题组在前期研究中购买了不同批次商品化的荧光标记 LPS,然而以上试剂在 LPS 刺激细胞的常规浓度范围内(100 ~ 1 000 ng/ml)均不能检出荧光,无法对 LPS 进行示踪研究,因此建立自行标记 LPS 的方法,制备可进行示踪研究的荧光标记 LPS 显得十分必要。



A～D：自标 FITC-LPS，刺激浓度分别为 100、200、400、800 ng/ml；E：FITC-LPS(Sigma)，刺激浓度为 800 ng/ml；F：Alexa Fluor® -LPS，刺激浓度为 800 ng/ml

图2 自标 FITC-LPS 和商品化荧光标记 LPS 在 RAW264.7 细胞中内化聚集的量效关系对比 (×40)

异硫氰酸酯(fluorescein isothiocyanate，FITC)是常用的荧光标记物，作为一种阳离子荧光染料，其标记原理主要是与生物大分子上的 NH_2-基团结合，但 FITC 标记 LPS 的机制目前并不明确。LPS 的毒性和活性中心类脂 A(Lipid A)上的磷酸基团可携带大量的负电荷，使 LPS 可与阳离子发生强烈的相互作用[6,7]。因此我们推测 FITC 标记 LPS 的原理可能与这种离子间的相互作用密切相关。

为将 FITC 分子标记在 LPS 分子上，需要首先将多聚体 LPS 解聚成单体[6]，本标记方法在使用持续振荡解聚 LPS 的同时，应用表面活性剂进一步抑制其聚合，使 FITC 能更有效地进行标记。完成标记后使用超滤离心管洗涤纯化，利用分子筛作用将游离荧光素和其他小分子杂质高效彻底地从标记 LPS 中分离。应用激光共聚焦显微镜逐层扫描观测标记效果，确证自标 LPS 示踪效果明显优于商品化试剂。最后为排除仪器和操作误差，用两种不同的检测仪器和方法，进行荧光检测并计算标记效率，得到一致的结果，其标记率为 1∶33.13(物质的量比)。本方法操作简便快速，结果确切可靠，具有广泛的应用前景。

参考文献：

[1] Albiger B, Dahlberg S, Henriques-Normark B, *et al*. Role of the innate immune system in host defence against bacterial infections: focus on the Toll-like receptors[J]. J Intern Med, 2007, 261(6): 511－528.

[2] Triantafilou M, Triantafilou F, Fernandez N. Rough and smooth forms of fluorescein-labelled bacterial endotoxin exhibit CD14/LBP dependent and independent binding that is influenced by endotoxin concentration[J]. Eur J Biochem, 2000, 267(8): 2218－2226.

[3] Troelstra A, Antal-Szalmas P, de-Graaf-Miltenburg L A, *et al*. Saturable CD14-dependent binding of fluorescein-labeled lipopolysaccharide to human monocytes[J]. Infect Immun, 1997, 65(6): 2272－2277.

[4] Li F Q, Hu J H, Zhu Q G. Interaction of soybean phospholipids based lipo-vesicle and surfactants of bile salts *in vitro*[J]. J Chin Pharma Sci, 2001,10 (3):136－139.

[5] Russell J A. Management of sepsis[J]. N Engl J Med, 2006, 355(16): 1699－1713.

[6] 蒋建新，姚咏明，郑 江. 细菌内毒素基础与临床[M]. 北京：人民军医出版社，2004：395.

[7] Raetz C R, Whitfield C. Lipopolysaccharide endotoxins[J]. Annu Rev Biochem, 2002, 71: 635－700.

(编辑 邓强庭)