

网络出版时间: 2016-6-22 14:44:58 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20160622.1444.014.html>

流式细胞术检测 IgD 与 IgD 受体结合实验方法的建立

陈恒石, 吴育晶, 黄琼, 陈文生, 董进, 魏伟

摘要 目的 建立非放射性荧光标记的配体受体结合实验, 检测 IgD 与其受体结合的作用特性。方法 以配体受体结合理论为基础, 利用荧光标记抗体技术, 建立非放射性配体受体结合实验方法。利用流式细胞术检测人 CD4⁺ T 细胞和人滑膜细胞上 IgD 与 IgD 受体结合的亲和力。结果 人 CD4⁺ T 细胞上 IgD 与 IgD 受体结合的解离常数 (K_D) 和受体最大结合容量 (B_{max}) 分别是 8.10×10^{-10} mol/L 和 6 605 相对值/ 10^4 细胞, 人滑膜细胞上 IgD 受体与 IgD 结合的 K_D 和 B_{max} 值分别是 7.02×10^{-10} mol/L 和 5 977 相对值/ 10^4 细胞。结论 该方法避免了传统受体与配体结合分析中放射性标记的问题, 操作简便、稳定性好、灵敏度及选择性均较高, 可为分析配体受体结合提供新的方法。

关键词 配体受体结合; 亲和力; IgD; 荧光标记

中图分类号 R 9-331

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2016)08-1105-06

2016-04-19 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81330081、81173075、81202596); 安徽医科大学“青年拔尖人才支持计划”项目; 高等学校博士学科点专项科研基金 (编号: 20113420120006、20123420110003); 安徽省科技攻关计划项目 (编号: 1301042098); 安徽省自然科学基金青年项目 (编号: 1408085QH173)

作者单位: 安徽医科大学临床药理研究所、抗炎免疫药物教育部重点实验室、安徽抗炎免疫药物协同创新中心, 合肥 230032

作者简介: 陈恒石, 男, 硕士研究生;

魏伟, 男, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: wwei@ahmu.edu.cn

免疫球蛋白 D (immunoglobulin D, IgD) 作为一类免疫球蛋白, 一方面可作为 B 细胞表面受体 (B cell receptor, BCR) 发挥免疫功能, 另一方面可以作为配体与其受体 (IgD receptor, IgD-R) 结合激活下游信号通路^[1]。在病理状态下, IgD 与 IgD-R 的过度结合, 可能导致自身抗体生成增多、自身免疫反应增强, 从而介导自身免疫疾病的发生。目前, 相关研究仅确定了 IgD-R 分布以及表达量, IgD-R 的编码基因和分子结构尚不明确, IgD 与 IgD-R 特异性结合后产生的相关作用及机制更是了解甚少^[2], 因此, IgD 与其受体结合的动力学参数是研究 IgD 和 IgD-R 特性的基础性环节。受体动力学特性的检测主要通过配体受体结合实验, 该方法考察的是受体与配体结合能力, 而非受体的功能, 且不涉及受体信号通路研究。经典的放射性配体受体结合 (radio-ligand-receptor binding assays, RRA) 实验方法应用放射性核素标记配体与特异性受体相结合, 研究受体的亲和力和受体的数量, 以及研究受体亚型, 广泛用于测定受体的密度和亲和力^[3-4]。鉴于 RRA 存在放射性元素标记困难, 需要进行安全防护, 放射性废物处理繁琐且费用昂贵等缺点, 该实验采用一种非放射性荧光标记抗体的技术, 来检测 IgD 与 IgD-R 结合的亲和力等特性, 克服了传统受体配体结合分析中放射性标记技术的问题, 为进一步筛选 IgD 与 IgD-R 结合的竞争性药物奠定实验基础, 并为药

leukemia cell line NB4. **Methods** NB4 cells were treated with citral for 48 h at the various concentration, and then the mRNA expression of mutation p53 (mtp53) and AIF was detected by method of qPCR. **Results** The expression of mtp53 gene decreased when the citral groups compared with the control group, the difference between them was statistically significant ($P < 0.05$); the expression of AIF gene was increased when the citral group compared with the control group, the difference between them was statistically significant ($P < 0.05$); ethanol group compared with the control group, mRNA expressions of mtp53 and AIF had no significant difference. With citral concentration (5, 10, 20 mg/L) increasing, the level of expression of mtp53 mRNA reduced, while the level of expression of AIF mRNA gradually increased, both mtp53 and AIF expression in different concentrations of citral group differences were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** Citral can induce apoptosis in NB4 cells by downregulating the expression of mtp53 and upregulating the expression of AIF.

Key words citral; leukemia; NB4; p53; apoptosis inducing factor

物结构设计和新药筛选提供有价值的参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 人外周血和滑膜组织的来源 抽取安徽医科大学第一附属医院体检中心健康志愿者静脉血 10 ml, 肝素钠抗凝; 正常者滑膜取材于安徽医科大学第一附属医院骨科外伤截肢患者, 均知情同意, 研究方案获得安徽医科大学伦理委员会批准。

1.1.2 主要试剂 人 IgD 蛋白 (美国 Abcam 公司); PE-抗 IgD 抗体、APC-Cy7 标记的链霉亲和素 (美国 BD 公司); DMEM 培养基、细胞培养基 (RP-MI-1640)、胰酶、胎牛血清 (美国 GIBCO 公司); 人 CD4 磁珠 (德国美天旌生物技术有限公司); 人外周血淋巴细胞分离液 (天津市灏洋生物制品科技有限公司)。

1.1.3 主要仪器 Napco-6100 CO₂ 细胞培养箱 (美国杜邦公司); FC500 型流式细胞仪 (美国贝克曼公司); 超纯水系统 (美国密理博公司); Vortex-Qilinbeier 5 涡旋仪 (海门其林贝尔仪器制造有限公司); 3-30K 高速离心机 (美国 Sigma 公司); MACS 分选器 (德国美天旌生物技术有限公司); MaxQ 6000 恒温箱 (美国赛默飞世尔科技公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 人外周血单个核细胞的制备 取 2 ml 淋巴分离液于离心管内, 同时用毛细吸管吸取约 2 ml 的血浆轻轻加入分离液上, 以水平转子离心机 1 500 r/min 离心 20 min。离心后, 可见分成多层, 最下层是红细胞, 中间层是分层液, 最上层是血浆。在血浆层与分层液之间是一薄层较致密的白色层, 即为单个核细胞层。用毛细吸管插入到单个核细胞层并吸取该层, 放入另一试管中, 计数细胞。

1.2.2 人 CD4⁺T 细胞的分离与鉴定 每 10⁷ 个/ml 细胞为一个单位, 1 500 r/min 离心 10 min 收集待分离细胞, 用少量生理盐水充分混悬细胞, 加入 CD4 磁珠 (10 ~ 20 μg/ml 终浓度), 4 °C 孵育 15 min。用 2 ml 生理盐水、1 500 r/min 离心 10 min 弃上清液, 再加生理盐水充分混悬细胞, 将分离柱安装入磁场中, 加入 2 ml 生理盐水, 在重力作用下自然流尽, 以预处理分离柱。将孵育完毕的细胞加入分离柱中, 自然流尽, 生理盐水洗柱 2 次, 取下柱子, 加 5 ml 生理盐水, 快速打出里面标记的细胞, 即为 CD4⁺T 细胞。取磁珠分选前后的细胞 1 × 10⁵, 离心, 弃上清液, 加入 80 μl PBS, 10 μl FITC-抗 CD4 抗

体, 混匀, 25 °C 恒温箱中避光放置 30 min, 流式细胞仪检测分析。

1.2.3 人滑膜细胞 (fibroblast-like synoviocytes cells, FLS) 的分离和培养 术中取出的滑膜组织于无菌条件下剪碎至 1 mm³ 大小, 用不含 Ca²⁺、Mg²⁺ 的 D-Hanks 液反复冲洗, 用玻璃吸管吸取均匀排列于培养瓶 (预先用含 20% 胎牛血清 DMEM 培养液湿润) 的底壁, 瓶底朝上, 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 6 h, 使其贴壁。再轻轻翻转培养瓶, 使培养液刚刚覆盖组织块, 每隔 2 ~ 3 d 换 1 次培养液, 观察到有大量成纤维细胞长出后轻轻取出组织块, 继续培养, 待细胞快长满时用 0.25% 胰蛋白酶消化细胞并传代培养, 取第 3 ~ 8 代细胞用于实验。

1.2.4 细胞形态学观察 倒置显微镜下动态观察 CD4⁺T 细胞和 FLS 的形态、数量的变化并拍照记录。

1.2.5 IgD 结合 CD4⁺T 细胞亲和力实验 人 CD4⁺T 细胞以 1 × 10⁶/孔的细胞密度铺 6 孔板, 加入含 0.1% BSA 的不同浓度 IgD (0.1、0.3、1、3、10、30 μg/ml) 作为结合组, 和非特异性结合对照组在 37 °C 恒温箱中孵育 2 h, 每孔总体积为 1 ml。PBS 洗涤细胞 2 次后用 2 000 r/min 离心 10 min, 去上清液后, PBS 100 μl 重悬细胞, 结合管加入 PE-抗 IgD 抗体 20 μl, 非特异性结合对照管加入同型对照抗体 20 μl, 25 °C 恒温箱孵育 30 min, PBS 洗涤细胞 2 次并用网纱过滤后用流式细胞仪检测荧光强度。

1.2.6 IgD 结合 FLS 亲和力实验 因为 FLS 为贴壁细胞, 在 IgD 结合受体前或结合后消化细胞, 设计方法 1 和方法 2 进行了比较。方法 1: 人 FLS 以 1 × 10⁶/孔的细胞密度铺 6 孔板, 待细胞贴壁长至 80% 并形态良好, 用 PBS 洗涤细胞 2 次, 0.25% 胰蛋白酶消化细胞, PBS 洗涤 2 次后用 2 000 r/min 离心 10 min, 去上清液后, 加入含 0.1% BSA 的不同浓度 IgD (0.1、0.3、1、3、10 μg/ml) 作为结合组, 和非特异性结合对照组在 37 °C 恒温箱中孵育 2 h, 每管总体积为 1 ml。孵育结束再次用 PBS 洗涤细胞 2 次, 2 000 r/min 离心 10 min, 去上清液后, PBS 100 μl 重悬细胞, 结合管加入 PE-抗 IgD 抗体 20 μl, 非特异性结合对照管加入同型对照抗体 20 μl, 25 °C 恒温箱中孵育 30 min, PBS 洗涤细胞 2 次并用网纱过滤后用流式细胞仪检测荧光强度。方法 2: 将 6 孔板中 FLS 细胞先用 PBS 洗涤细胞 2 次, 在板中加入含 0.1% BSA 的不同浓度 IgD (0.1、0.3、1、3、10 μg/ml) 作为结合组, 和非特异性结合对照组在 37 °C 恒

温箱中孵育 2 h, 每孔总体积为 1 ml。PBS 洗涤细胞 2 次, 0.25% 胰蛋白酶消化细胞, PBS 洗涤 2 次后以 2 000 r/min 离心 10 min, 去上清液后, PBS 100 μ l 重悬细胞, 按方法 1 中步骤加入流式抗体孵育并上机检测。

1.2.7 绘制饱和曲线 配体 IgD 与 IgD-R 的结合特性用荧光强度 (fluorescent intensity, FI) 值来计算。根据流式细胞仪检测结果, 设置同型对照管为非特异性结合管, 其他各浓度组的荧光强度减去同型对照管荧光强度即为各浓度组 IgD 的特异性结合的量, 以不同浓度 IgD 为 X 轴, 对应的特异性结合量为 Y 轴, 绘制饱和曲线。

1.2.8 最大结合量 (maximum binding capacity, $B_{\max}$) 和解离常数 (dissociation constant, K_D) 根据饱和曲线, B 表示受体与配体特异性结合的量, 故 IgD 最大结合量用 $B_{\max}$ 表示, F 代表配体浓度 (即 IgD 浓度), K_D 为解离常数, 根据公式:

$$\frac{B}{F} = \frac{B_{\max}}{K_D} - \frac{B}{K_D}$$

转换为 Scatchard 方程, 用 B/F 对 B 作图, 可得直线, 其斜率为 $-1/K_D$, 纵轴截距为 B/K_D , 横轴截距为 $B_{\max}$, 藉此可求出 K_D 和 $B_{\max}$ [6]。

2 结果

2.1 人 CD4⁺ T 细胞的鉴定 经流式细胞仪检测, 原 PBMC 中 CD4⁺ T 细胞占 28%, 分选后 CD4⁺ T 细胞纯度为 96% (图 1), 符合后续实验的要求。

2.2 人 CD4⁺ T 细胞亲和力实验 为了检测 IgD 与 CD4⁺ T 细胞上 IgD-R 之间结合的亲和力, 本实验采用流式细胞术检测 IgD 配体与其受体的结合。不同浓度 IgD 与 IgD-R 结合, 结合的孵育条件是 37 $^{\circ}$ C, 孵育抗体后, IgD 与 IgD 流式抗体结合发出荧光, 可通过流式细胞仪收取并获得 1×10^4 个细胞, 检测其平均荧光强度 (mean fluorescent intensity,

MFI)。结合总细胞数 (1×10^4) 计算总 FI, 并根据 IgD 浓度和结合后的 FI 作出结合曲线 (图 2、3), 再转换成 Scatchard 直线方程 (图 4) $Y = -6.5913X + 43535$, $r = -0.967$ 。计算出解离常数 K_D 和受体最大结合容量 $B_{\max}$ 分别是 8.10×10^{-10} mol/L 和 6 605 相对值/ 10^4 细胞。

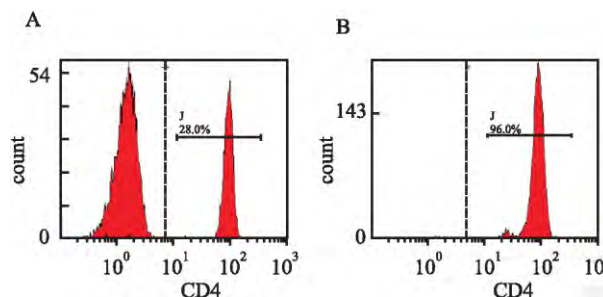


图 1 分选前后人 CD4⁺ T 细胞纯度的鉴定

A: 分选前人 CD4⁺ T 细胞的纯度; B: 分选后人 CD4⁺ T 细胞的纯度

2.3 人 FLS 亲和力实验 人 FLS 为贴壁细胞, 胰酶消化前后细胞的形态差异较大, 实验比较了两种处理方法后的结果。第一种先将滑膜细胞消化, 再进行 IgD 配体与其表面 IgD-R 结合 (方法 1); 第二种是维持滑膜细胞的形态, 在 IgD 配体先与细胞表面 IgD-R 结合后再消化细胞, 并检测 (方法 2)。比较两种方法得到的结合曲线 Scatchard 直线方程等参数 (图 5)。比较 IgD 在 FLS 消化后结合受体的结果与先结合受体后消化的结果显示: 方法 1 的 Scatchard 直线方程是 $Y = -2.77X + 5265$, 方法 2 的 Scatchard 直线方程是 $Y = -7.61X + 45492$; 其中方法 1 的 K_D 值为 1.95×10^{-9} mol/L, 显著大于方法 2 的 7.02×10^{-10} mol/L; 方法 1 的 $B_{\max}$ 值为 1 894 相对值/ 10^4 细胞, 显著小于方法 2 的 5 977 相对值/ 10^4 细胞, 表明方法 1 检测的亲和力和结合力都偏小, 且方法 1 线性回归的相关系数为 -0.733 , 低于

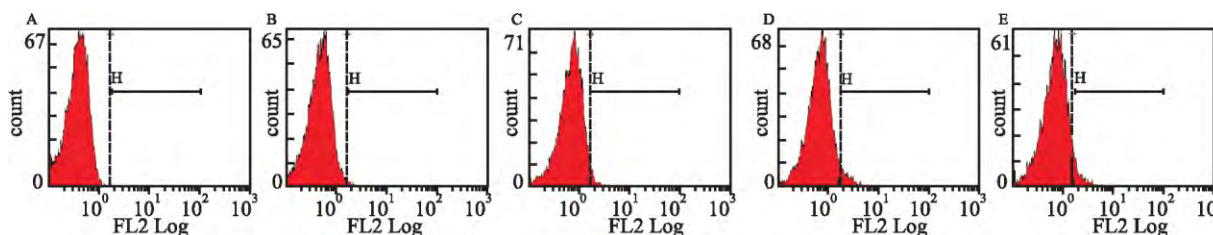


图 2 流式细胞术检测不同浓度 IgD 及其受体结合后 MFI 的变化

A: Isotype 的 MFI: 0.59; B: 1 μ g/ml 的 IgD 与其受体结合后的 MFI: 1.02; C: 3 μ g/ml 的 IgD 与其受体结合后的 MFI: 1.08; D: 10 μ g/ml 的 IgD 与其受体结合后的 MFI: 1.24; E: 30 μ g/ml 的 IgD 与其受体结合后的 MFI: 1.7

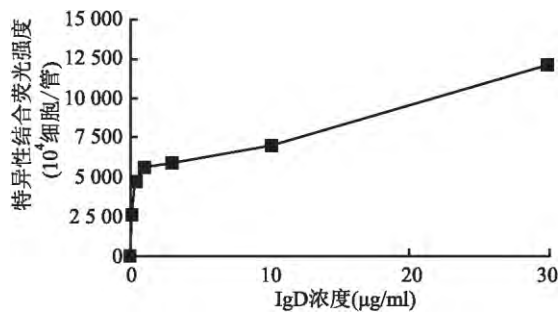
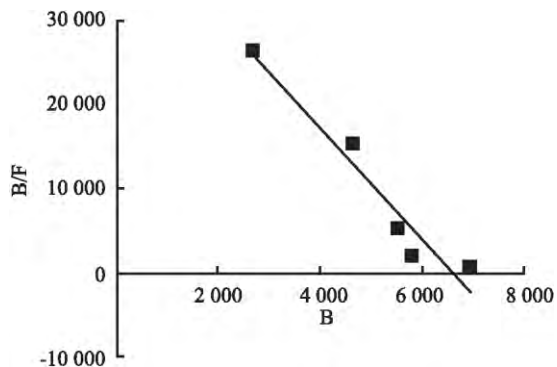
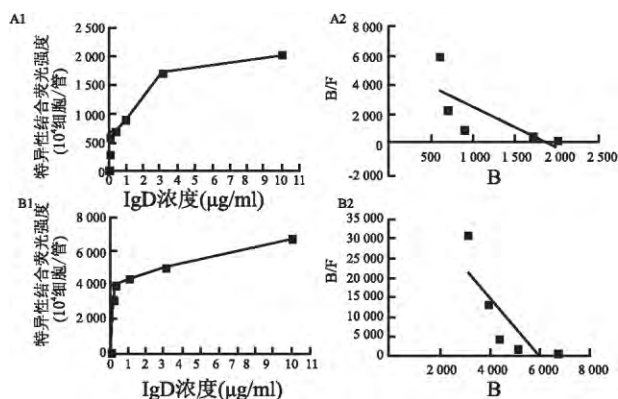
图3 IgD 结合 CD4⁺ T 细胞表面 IgD-R 饱和曲线图4 IgD 结合 CD4⁺ T 细胞表面 IgD-R 转换成 Scatchard 直线方程

图5 比较两种方法 IgD 结合人 FLS

表面 IgD-R 的饱和曲线和 Scatchard 直线方程

A: 方法 1; B: 方法 2; 1: IgD 结合 FLS 表面 IgD-R 饱和曲线; 2:

Scatchard 直线方程

方法 2 的 -0.817 , 可能由于 FLS 形态变化导致了细胞表面 IgD-R 数量减少, 造成亲和力降低和数据精确性不够等问题。因此, 对于贴壁细胞, 实验优先选用在 IgD 配体先与细胞表面 IgD-R 结合后再消化细胞的操作方法。

3 讨论

根据 Clark 的占领理论, 受体与配体之间的相互作用是可逆的, 受体与配体的结合反应遵循质量

作用定律, K_D 值表示受体与配体亲和力的大小, 值越小, 亲和力越大。绘制的饱和曲线的高度反映了受体数量的多少, 曲线上升的快慢则反映受体和配体的亲和力大小, 即亲和力越大, 曲线上升越快^[8]。

受体与配体的结合反应一般都较快(多数在数十秒至数十分钟)达到平衡。在反应体系中加入定量配体及定量受体, 于反应开始后不同时间测定特异性结合配体量, 可以计算出反应动力学的常数。多点饱和法是受体结合分析常用的方法, 指在一定量的受体样本中, 逐步增加配体的量, 使受体结合趋于饱和可通过曲线拟合法或直线拟合法计算受体结合容量和配体与受体结合的亲和力(用 K_D 表示)^[9]。

受体数量的检测通常主要通过配体与受体直接结合的方法, 目前有许多技术和方法应用于受体配体结合实验。传统的受体配体结合实验较为简单, 将配体与一个合适的标记相结合, 与另一个结构类似的化合物相竞争, 共同作用于受体上, 并在受体适宜的浓度下进行孵育。这样的方法通常用于药物的筛选、诊断和环境的研究^[8]。过去几十年, 配体主要用放射性的 ^3H 或者 ^{125}I 进行放射性标记。近几年一方面由于非同位素的标记发展, 另一方面伴随着荧光强度分析、荧光共能量转移等荧光技术的发展, 利用荧光标记抗体方法来检测配体与受体结合得到广泛关注。荧光标记技术因具有操作简便、稳定性好、灵敏度及选择性均较高等特点, 已广泛应用于体内外药物的定量检测中。

荧光标记技术是一种非放射性的标记技术, 其通过将能发射荧光的物质共价结合或物理吸附在所研究分子的某个基团上, 使后者也能具有某种能被定性及定量检测的荧光特性, 并由此提供给研究者需要获得的被研究对象的相关信息。目前国外已有文献^[8]报道将荧光标记技术应用于受体配体结合实验中, 有人利用荧光分光光度计来检测标记在配体上的荧光探针的 MFI。检测免疫球蛋白 IgM 及 B 细胞刺激因子与其受体结合特性时也利用了荧光标记替代放射性标记, 并利用流式细胞仪来检测 MFI, 灵敏度更高, 并且可以更加准确地计算细胞的平均 MFI^[10-11], 利用荧光标记检测配体受体结合实验的方法研究不多, 有其重要价值。

与其他 Ig 类型类似, IgD 除了作为 B 细胞表面受体 BCR 发挥免疫功能, 还可以作为配体与其受体结合激活下游信号通路, 而 IgD-R 的基因序列结构等尚未知, 所以经典的配体受体结合实验对于研究

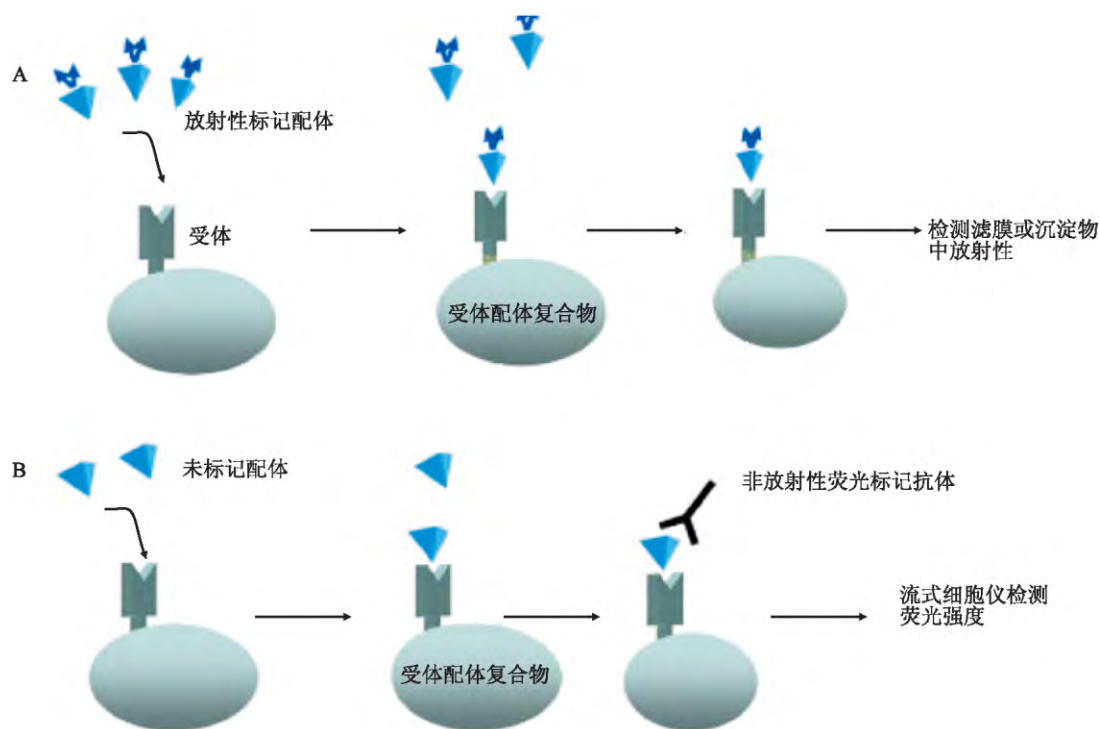


图6 放射性配体受体结合实验和荧光标记配体受体结合实验原理的比较

A: 经典的放射性受体与配体结合实验; B: 荧光标记抗体受体配体结合实验

IgD 与 IgD-R 之间受体动力学特性必不可少。通过借鉴放射性配体受体结合实验原理,利用荧光标记的抗体代替了传统的放射性标记的配体,再利用流式细胞术检测 MFI,建立了荧光标记配体受体结合实验方法,并首次将此方法应用于 IgD 与 IgD-R 的结合实验中(图6)。

传统放射性配体受体结合实验中不可避免的是非特异性结合。非特异性结合是放射配体与靶受体以外的位点结合,非特异性结合的测定对计算配体的特异结合是非常重要的。非特异性结合包括组织中非靶受体的结合,非组织(如滤纸)的结合和未被冲洗掉的游离放射配体。在本实验中标记同型抗体作为非特异性结合管,同时利用孵育液中的牛血清白蛋白(0.1%)来减弱非特异性结合的作用,并且通过流式细胞术识别细胞避免了部分非组织结合。一个普遍的问题是用于标记配体的荧光染料不能影响到配体受体之间本身的特性,且不能削弱配体和受体之间的亲和力^[2]。本实验中配体 IgD 先与 IgD-R 受体结合,再利用 IgD 的荧光抗体检测已结合的 IgD,避免了这些问题。

本实验利用建立的配体受体结合实验分别检测了 CD4⁺T 细胞和 FLS 细胞表面 IgD 与 IgD-R 结合的动力学特征,其中 CD4⁺T 细胞为悬浮细胞,FLS

细胞为贴壁细胞。已有文献^[3]报道人 CD4⁺T 细胞上有 IgD-R 表达,而人滑膜细胞 FLS 上是否也有 IgD-R 表达目前没有文献报道,我所前期实验显示人滑膜细胞上有 IgD-R 的表达。在本文中利用配体受体结合实验检测出 IgD 与人 CD4⁺T 细胞和 FLS 上 IgD-R 结合的 K_D 值理论上是相近的,分别为 0.810 nmol/L 和 0.702 nmol/L,说明 IgD 分别与人 CD4⁺T 细胞和 FLS 上 IgD-R 结合的亲和力相似,也证实了 FLS 上有 IgD-R 的存在,说明 IgD-R 在此两种不同的细胞上受体特性相近,都发挥重要的免疫学功能。本文选用的 FLS 为贴壁细胞,胰酶消化前后细胞的形态差异较大,通过设计方法1和方法2比较胰酶消化对结合实验的影响。结果显示:FLS 消化后形态变化较大,会影响到 IgD 与其受体的结合,故而在贴壁细胞的结合实验中,建议采用配体受体结合后再消化细胞的方法。

本文建立的配体受体结合实验也有一定的局限性:首先,要求被检测的细胞中不含有配体(如 IgD)的干扰;另外,由于流式细胞仪的局限性,本方法适用于细胞表面配体受体结合实验,而不适用于组织中的配体受体结合实验。

流式细胞术在受体与配体结合分析中的应用为配体与受体结合分析开辟了新的途径,该方法避免

了放射性和荧光分析中存在的问题,利用荧光抗体标记配体代替放射性配基,避免了放射性元素标记困难、需要进行安全防护、放射性废物处理繁琐而且费用昂贵等缺点。

参考文献

- [1] 吴育晶,黄琼,陈文生,等. IgD 及其受体功能和信号研究进展 [J]. 生理科学进展, 2014, 45(1): 37-41.
- [2] 陈文生,黄琼,魏伟,等. IgD 在自身免疫病中作用的研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2014, 30(3): 297-300.
- [3] Dowie M J, Bradshaw H B, Howard M L, et al. Altered CB1 receptor and endocannabinoid levels precede motor symptom onset in a transgenic mouse model of Huntington's disease [J]. *Neuroscience*, 2009, 163(1): 456-65.
- [4] Kruse A C, Hu J, Pan A C, et al. Structure and dynamics of the M3 muscarinic acetylcholine receptor [J]. *Nature*, 2012, 482(7386): 552-6.
- [5] 魏伟,吴希美,李元建. 药理实验方法学 [M]. 4版. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 128-9.
- [6] Wu C H, Li K J, Siao S C, et al. The binding affinity and molecular basis of the structure-binding relationship between urinary Tamm-Horsfall glycoprotein and tumor necrosis factor- α [J]. *Molecules*, 2012, 17(10): 11978-89.
- [7] Bigott-hennkens H M, Dannoon S, Lewis M R, et al. *In vitro* receptor binding assays: general methods and considerations [J]. *Q J Nucl Med Mol Imaging*, 2008, 52(3): 245-53.
- [8] Marcheselli V L, Mukherjee P K, Arita M, et al. Neuroprotectin D1/protectin D1 stereoselective and specific binding with human retinal pigment epithelial cells and neutrophils [J]. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2010, 82(1): 27-34.
- [9] Gu S H, Wang W X, Wang G R, et al. Functional characterization and immunolocalization of odorant binding protein 1 in the lucerne plant bug, *Adelphocoris lineolatus* (GOEZE) [J]. *Arch Insect Biochem Physiol*, 2011, 77(2): 81-9.
- [10] McCall J R, Jacocks H M, Niven S C, et al. Development and utilization of a fluorescence-based receptor-binding assay for the site 5 voltage-sensitive sodium channel ligands brevetoxin and ciguatera [J]. *J AOAC Int*, 2014, 97(2): 307-15.
- [11] Chang S K, Mihalcik S A, Jelinek D F. B lymphocyte stimulator regulates adaptive immune responses by directly promoting dendritic cell maturation [J]. *J Immunol*, 2008, 180(11): 7394-3.
- [12] Degorce F, Card A, Soh S, et al. HTRF: A technology tailored for drug discovery-a review of theoretical aspects and recent applications [J]. *Curr Chem Genomics*, 2009, 3: 22-3.
- [13] Wu Y, Lakshmi Tamma S M, Lima V, et al. Facilitated antigen presentation by B cells expressing IgD when responding T cells express IgD-receptors [J]. *Cell Immunol*, 1999, 192(2): 194-2.

Novel fluorescence based ligand-receptor binding assay : study on IgD receptor

Chen Hengshi, Wu Yujing, Huang Qiong, et al

(*Institute of Clinical Pharmacology, Anhui Medical University, Key Laboratory of Anti-Inflammatory and Immune Medicine, Ministry of Education, Collaborative Innovation Center of Anti-Inflammatory and Immune Medicine in Anhui Province, Hefei 230032*)

Abstract Objective To establish a fluorescence method for the detection of receptor binding assay and to detect the affinity of IgD ligand receptor binding. **Methods** Based on the experimental results of the ligand receptor binding assay, fluorescence based receptor binding assay was established using fluorescent labeled antibody. The binding affinity of IgD receptors on human CD4⁺ T cells and human fibroblast-like synoviocytes (FLS) was detected by flow cytometry. **Results** The dissociation constant (K_D) and the maximum binding capacity (B_{max}) of IgD receptors on human CD4⁺ T cells were 0.810 nmol/L and 6 605 arbitrary unit/ 10^4 cells, respectively. The K_D and B_{max} value of IgD receptors on human FLS was 0.702 nmol/L and 5 977 arbitrary unit/ 10^4 cells respectively. **Conclusion** This method avoids the defects of the radioactive label in the binding of the receptor and the ligand, and offers simple operation, good stability, high sensitivity, which can provide a new way for the ligand and receptor binding.

Key words ligand receptor binding; affinity; IgD; fluorescence based receptor binding assay