

蛋白质和多肽的放射性碘标记技术及其应用

中日友好医院临床医学研究所 胡明 综述

中国医学科学院放射医学研究所 林汉 审

随着商品无载体放射性碘生产技术的不断进步,人们已经能用多种方法对许多蛋白质、多肽及其他化合物成功地进行碘标记,得到了具有完整生物活性和免疫活性的高比放射性、高纯度产品。特别是近年来发展的对生物膜和生活细胞的碘标记,更进一步扩展了碘标记技术的应用领域。由于 ^{125}I 能量和半衰期均适中,丰度高,容易测量,用量急剧增加,在某些方面还有取代 ^3H 、 ^{14}C 等核素的趋势。

蛋白质和多肽的碘标记技术主要应用于以下几个方面:①为放射免疫分析和放射受体分析等体外生化测定、蛋白质代谢和生理功能研究、药代动力学和示踪动力学研究及放射自显影方法提供示踪物;②蛋白质和多肽结构的研究及其侧链上某些官能团同它的生物学功能关系的研究;③生物膜结构和膜受体的研究;④标记单克隆抗体及其片断在肿瘤诊治和基础医学方面的应用。

一、碘标记方法

(一) 氯胺-T法

改进了的氯胺-T法最初由Hunter和Greenwood报道^[1]。它是一种高效、广谱、简便的碘化方法,且标记的重复性较好。因此,是目前使用最多的方法^[2]。

碘标过程:反应通常在小玻璃管中于室温下进行。为提高碘标效率,应尽量减少反应体积。依次加入蛋白质溶液(溶解在 0.1mol/L 磷酸盐缓冲液中, $\text{pH}7\sim7.5$)几微克到几十微克,放射性碘溶液零点几到几毫居里,氯胺-T。反应时间通常为几秒钟到几分钟。加入偏重亚硫酸钠终止反应,然后分离碘化产物和游离放射性碘。

标记过程应考虑的问题:①欲标蛋白质中不能含有还原性物质,包括防腐剂,以免破坏碘化反应的前体^[2]。②氯胺-T在光中不稳定,其溶液应在反应前配制^[3]。③氯胺-T用量应严格控制。用量过多会产生不必要的副反应,明显降低标记产物的生物学活性^[3],用量不足又会降低标记率。用量由欲标蛋白质的性质和质量决定,一般氯胺-T与蛋白质克分子数相等^[4]或与无机碘克分子数相等^[5]。④反应时间的选择很大程度上决定了产物的碘标效率和活性保持。

方法的改进与特殊用法:①碘化反应中氯胺-T与蛋白质的直接接触,其较强的氧化作用能造成标记蛋白质的损伤及生物学性质的丧失。Sprinkle^[6]发明改进方法:碘化过程加入保护剂-硫代氧化物,其中效果较好的是二甲基亚砷。②Elder等人^[7]报道了用SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质,再用氯胺-T法对凝胶中的蛋白质进行碘标,即所谓微量碘标方法。随后蛋白质经胰蛋白酶处理从凝胶中分出作进一步的分析。Krakow^[8]发展了此方法,通过放射自显影,可对毫微克级的蛋白质定量测定。

(二) 乳过氧化物酶法

此方法是在有过氧化氢存在时,进行蛋白质和多肽的酶促碘化方法。最早由Marchalonis报道^[9]。70年代初,Morrison等人^[10]和Thorell等人^[11]分别改进了此方法,得到了高比放射性的标记蛋白质。

乳过氧化物酶法也已被广泛应用^[12]。突出优点是反应条件温和,过氧化氢和无机碘这两种底物只需极低浓度($1\times 10^{-6}\text{mol/L}$)即能发生反应^[10]。反应时间短,操作简单易控制。

由于反应体系中氧化物(H_2O_2)水平低,通常能保持产物的结构完整性和很高的生物活性^[13]。

碘标过程:乳过氧化物酶已有商品提供,实验室提取制备方法也较简单^[11]。碘化反应在室温下进行,小试管中依次加入无载体 Na^{125}I 、欲标蛋白质、乳过氧化物酶、 H_2O_2 ,整个反应体系处于 0.05mol/L 磷酸缓冲液中, pH $7.4\sim 7.5$ 。每隔1分钟加一次 H_2O_2 ,量不变,共4次。用缓冲液稀释或加叠氮钠、半胱氨酸终止反应,通过凝胶过滤等方法分离纯化标记蛋白质。

使用此法要考虑的问题:①碘化反应速率分析结果表明^[10],酶催化速度快,可在很低蛋白质浓度中进行。②碘化反应在 $\text{pH}4.0\sim 8.5$ 较宽范围内均可进行^[10],最适值根据蛋白质本身性质选择^[11],应使蛋白质距其生理构象越近越好^[10]。③乳过氧化物酶的用量应少于总蛋白质用量的1%^[10],以减少酶的自身碘化。④碘应在低浓度(一般 $\leq 1\times 10^{-4}\text{mol/L}$)下使用,有利于产生高比放射性的产物。⑤ H_2O_2 应保持低浓度。高浓度 H_2O_2 ($>1\times 10^{-4}\text{mol/L}$)能抑制酶活性^[14],也会损伤蛋白质。标记量大时,可分几次加入。

方法的改进:①固相酶法:乳过氧化物酶法的一个缺点是向碘化体系中又引入一种蛋白质,即酶本身,这就给标记产物的分离纯化带来了困难。David^[15]将乳过氧化物酶共价联接在被溴化氰活化的Sephrose 4B固相上。碘化反应在离心管内进行,反应终止后,由离心除去固相酶,再经三氯乙酸沉淀,得到标记产物。此法缺点是酶的自身碘化较严重。②葡萄糖氧化酶-乳过氧化物酶(GO-LPO)法: Tower等人^[16]利用葡萄糖氧化酶在底物 $\beta\text{-D}(\text{+})$ 葡萄糖和 O_2 存在时,连续产生少量、易控制的 H_2O_2 的性质,将此反应与乳过氧化物酶催化碘化偶联,以代替加 H_2O_2 过程,标记产物生物活性更高。目前已广为使用。

(三) Bolton-Hunter试剂法(联接标记法)

Bolton和Hunter^[17]报道了用放射性碘化的3-(4-羟基苯)丙酸N-羟基琥珀酰亚胺酯标记hGH、hTSH、和hLH,均得到较高比放射性,且有很高的免疫活性。此后人们用此法标记了许多蛋白质和其他生物活性物质^[18]。

碘标过程:向反应管中加入 ^{125}I -Bolton-Hunter试剂(该试剂有商品出售,实验室制备方法也较简单^[19]),氮气吹干,冷却至 0°C ,加蛋白质溶液,摇动15分钟,加甘氨酸,再摇动5分钟,破坏未反应的碘化酯。经凝胶过滤,收集产物。

本法特点:此法在一定程度上克服了其他方法无法克服的困难。对于本身缺乏酪氨酸残基的蛋白质(如猪甲状旁腺激素)及酪氨酸残基在活性中心构成方面起重要作用的蛋白质,碘原子的引入会造成蛋白质构象的转变,导致活性丧失,而用此法有可能得到较理想的结果。此是间接标记,避免了欲标蛋白质与氧化剂及无机碘的直接接触,从而避免了可能造成的蛋白质损伤。一般认为此法不宜标记短肽^[4],而适于分子量大于一万的蛋白质。

(四) Iodogen法

Iodogen即1, 3, 4, 6四氯-3 α , 6 α -二苯甘脲,与氯胺-T同属氯酰胺,但它不溶于水,为固相催化剂。Fraker和Speck^[20]首先报道用此法标记九种蛋白质和两种细胞。此后,人们用此法标记多种蛋白质^[21]和生活细胞^[22]。

碘标过程:①涂管:将溶有Iodogen的二氯甲烷溶液几十微升加至反应管底部,氮气吹干,则管底形成Iodogen薄膜。涂好的管可在 -20°C 长期保存使用^[21]。②碘化:将配好的 Na^{125}I 和蛋白质溶液移入反应管,反应自发进行,5到20分钟后倾倒入反应液则反应终止^[20]。

Iodogen法具有反应温和,标记效率高,对蛋白质损伤小,操作更简单等优点。又由于它在标记生活细胞方面的特性,使用量逐渐增多。

(五) 电解法

最初由Pennisi和Rosa报道^[23]。后有Donabedian等人^[24]和Sammon等人^[25]分别建立微量电解法,可标记少到5 μg 的蛋白质,均得到较高比放射性的产品。碘化反应在一小坩埚中进行,控制极间电压(或电流),使反应氧化势高到能使 I^- 氧化成 I_2 ,但要低于能导致蛋白质中蛋氨酸残基被氧化的程度。

此法最大特点是碘化条件温和,避免了蛋白质与氧化剂的直接接触。碘被平均地分布在所有的蛋白质分子上,产品纯化纯度很高,能保持生物学活性,更适于标记易变性的蛋白质和多肽(如甲状旁腺激素^[26])。但由于此法需特殊装置,不如前述几种方法使用普遍。

(六) 其他碘标方法

氯气法:此法由Butt首先建立,此后逐渐简化^[27]。它利用氯胺-T与 NaCl 反应生成的 Cl_2 作为氧化剂,避免氯胺-T与蛋白质接触,减少了蛋白质损伤。

次氯酸钠法:最初由Redshaw和Lynch报道^[28]。反应类型与氯气法近似,与化学碘化法缺点相同:氧化损伤较强。

N-溴代琥珀酰胺法:Reay^[29]报道用N-溴代琥珀酰胺为弱氧化剂,标记了几种激素,比放射性达 $136\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$,产物免疫活性等于或高于氯气法、Iodogen法和氯胺-T法。此试剂价廉,性质稳定,使用方便。

氰化亚铜法:Escher^[30]报道用氰化亚铜催化碘化的新方法。其特点是催化苯丙氨酸残基中苯环对位上碘取代。但氰化亚铜是剧毒物,这也许成为本法广泛使用的一个限制。

光解联接法:1984年,Denny和Blobel^[31]报道合成了交联试剂:N-(4-(对-叠氮-间^[125]I)碘苯偶氮)苯甲酰-3-氨丙酸-N'-羟基磺基琥珀酰亚胺酯。此试剂为水溶性,可光解。将此放射性交联剂通过共价键联接到固化在Sephrose上的蛋白质A上,若加入人血清,366nm照光,则交联剂从偶氮键处断裂,将部分放射性转移到人血清IgG分子上。此法已成为受体研究和蛋白质间相互作用研究的良好

工具。

(七) 碘标方法的选择

通常很难简单回答上述方法孰优孰劣,而要依据欲标蛋白质本身的性质、应用标记物的目的和各种标记方法的特点,具体选择理想的碘标记方法和标记条件。这里建议,有条件的活,应使用两种以上的方法标记,以择其优。

二、碘标产物的分离纯化和贮存

分离和纯化方法有:①透析:能将产物与小分子反应剂很好地分离,适用于氯胺-T等化学碘化法^[2]。②三氯乙酸沉淀:能快速、简便地将产物与小分子反应剂分离^[10,20]。可加0.05mol/L的无机碘化物(如KI)为碘载体。③离子交换层析:适于分离纯化短肽标记物^[32]。④凝胶过滤:由于它操作简便,分离效果好,使用最广泛。常用的是Sephadex G系列,也有用Bio-gel-P系列。⑤Con A吸附:伴刀豆球蛋白A是一种植物凝集素,对糖蛋白有良好的吸附能力,因此适于分离标记糖蛋白^[32]。⑥电泳:可用来分离单碘化和多碘化蛋白质^[12,25]。其中等电聚焦法曾成功地分离纯化了标记胰岛素^[33]。⑦受体亲和纯化:利用蛋白质与其特异受体的亲和分离碘标蛋白质,通常用受体含量丰富的细胞质膜,制成膜碎片悬液,与具有生物活性的标记蛋白质结合,离心分离^[34,35]。此法能保持很高的生物活性,但操作复杂。⑧高效液相色谱:近年来使用者增多^[30,36]。此法分离效果好,快速,但需特殊设备。

标记物的贮存:贮存期间要尽量减少标记蛋白质的变性和分解。变性原因可能是蛋白质浓度低和贮存温度过高^[2]。分解原因是贮存液中含杂质酶^[4]和蛋白质辐射自分解^[2,37]。为避免变性和分解,可加保护剂。最常用的是BSA。此外,EDTA、甲硫咪唑、丙基硫尿嘧啶和丙二醇都对分解有抑制作用^[35]。标记物一般需冷冻干燥或在 -20°C 到 -70°C 贮存^[2,11,13],某些情况下,可在 4°C 左右短期贮存^[4,16]。

三、碘标蛋白质的生物活性与免疫活性

(一)导致活性改变的因素

碘化反应中引起活性改变的因素有：①碘原子参入量；②蛋白质中一些氨基酸残基的氧化；③蛋白质变性因素；④碘源中的杂质^[37]。

蛋白质分子上碘标记量的影响：对多数蛋白质来说，碘标程度对其生物学性质的保持有决定性影响。每分子中碘数目越少，活性改变越小。要实现单碘化^[10]，即每个蛋白质分子中只引入一个碘原子。一个蛋白质分子可参入的碘原子总数在很大程度上取决于它的能被碘取代的氨基酸残基数目。而在一般标记条件下，出现损伤的可能性则更取决于这类氨基酸残基的分布和反应性。随着蛋白质碘化程度的提高，关键氨基酸残基被碘化的可能性增加，因而失活的可能性相应增加。对放射免疫分析等，单碘化蛋白质的比放射性已能满足灵敏度的需要^[37]。已有的标记方法（包括催化能力很强的氯胺-T法），如果使用得当，对许多蛋白质能实现单碘化。

氧化反应损伤：氧化损伤主要由氧化剂直接造成，或由氧化的碘造成。氧化损伤涉及蛋氨酸和色氨酸残基及二硫键^[37, 38]。选择合适的碘化方法和条件能有效地减少氧化损伤。

(二)生物活性和免疫活性的鉴定

放射免疫测定和放射受体测定：将碘标产物直接用于实际使用过程当然是检查标记蛋白质活性最好的方法。这里主要的是检查标准曲线，即剂量-效应曲线的质量^[16, 17, 25]。对抗体和受体的最大结合率的测定是快速而有效的鉴定方法^[11, 35]。

Talc-Resin-TCA 筛选法：由 Tower 等人^[39]建立，极其简便，过程如下：取三支加有等量稀释的¹²⁵I-蛋白质的试管，分别加入一定量的滑石粉、Dowex AG1-X 100 阴离子交换树脂和三氯乙酸，离心后分离沉淀与上清，分别测量各部分的放射性，计算各管沉淀率。若滑石粉管和三氯乙酸管的沉淀率均大于90%，二者之差小于3%，树脂管的沉淀率小于25%，

则此标记物适用于放射免疫分析。

四、碘标记物和碘标反应的其他应用

生物膜结构研究：由于酶促碘化反应的选择性，可以作为研究蛋白质在膜结构中的分布、构象的有力工具。乳过氧化物酶是大分子量蛋白质，不易穿过细胞膜。若选择合适条件，它只催化细胞膜一侧与它接触的膜蛋白的碘化。Morrison 推荐了一种乳过氧化物酶法标记淋巴细胞质膜的方法^[12]。

细胞表面受体研究：利用乳过氧化物酶催化碘化的性质，将它与配基或抗原通过共价键联接起来，这个复合物再与细胞表面受体特异结合，此时若加入酶促碘化底物，则乳过氧化物酶能特异地催化这种细胞表面受体的碘化。由此可对这种受体做进一步的鉴定和探讨。Choi 等人^[40]通过此方式研究了淋巴细胞表面的抗原结合受体（ABR）。

蛋白质分子结构的研究：乳过氧化物酶法碘化温和，对蛋白质的碘化程度不是依赖于蛋白质总的酪氨酸残基数目，而是依赖于蛋白质中可被碘化的酪氨酸残基数目。通常是那些处于蛋白质三维结构表面的酪氨酸残基被碘化，再经内切酶技术和电泳、纸层析等分析，这对蛋白质结构的研究是有一定意义的^[36]。碘原子引入处于蛋白质活性中心的酪氨酸残基，常会导致蛋白质活性丧失，利用这一性质，可帮助分析蛋白质活性中心的构成。

碘标记单克隆抗体用于肿瘤定位：随着单克隆抗体技术的不断发展，将抗肿瘤细胞单克隆抗体标记上放射性核素，如¹³¹I、¹²⁵I等，配以γ-照像技术，对肿瘤作放射免疫定位，已经展示出良好的前景。已有大量文献报道了这方面的研究工作^[41]。

参考文献

1. Hunter WM & Greenwood FC: Nature 194: 495, 1962.
2. McConahey PJ & Dixon FJ: Methods Enzymol 70: 210, 1980.

3. Eckelman WC et al, *Cancer Res* 40:3036, 1980.
4. Heber D et al, *Clin Chem* 24:796, 1978.
5. Pettit WA et al, in "Tumor Imaging" (Burc-hiel SW & Rhodes BA ed.) p99, Masson Pub USA Inc, New York, 1982.
6. Sprinkle LM, US Patent 4219538, 1980.
7. Elder JH, *J Biol Chem* 252:6510, 1977.
8. Krakow JS, *J Virol Methods* 7:273, 1983.
9. Marchalonis JJ, *Biochem J* 113:299, 1969.
10. Morrison M et al, *Immunochem* 8:289, 1971.
11. Thorell JI & Johansson BG, *Biochem Biophys Acta* 251:363, 1971.
12. Morrison M, *Methods Enzymol* 70:214, 1980.
13. Miyachi Y & Chrambach A, *Biochem Biophys Res Commun* 46:1213, 1972.
14. Morrison M & Bayre GS, *Biochem* 9:2995, 1970.
15. David GS, *Biochem Biophys Res Commun* 48, 464, 1972.
16. Tower BB et al, *Life Sci* 21:959, 1977.
17. Bolton AE & Hunter WM, *Biochem J* 133: 529, 1973.
18. Langone JJ, *Methods Enzymol* 70:221, 1980.
19. Rudinger J & Ruegg U, *Biochem J* 133, 538, 1973.
20. Fraker PJ & Speck JC, *Biochem Biophys Res Commun* 80, 849, 1978.
21. Salacinski PRP et al, *Anal Biochem* 117: 136, 1981.
22. Moutsatsos IK et al, *Anal Biochem* 148: 408, 1985.
23. Pennisi F & Rosa U, *J Nucl Biol Med* 13: 64, 1969.
24. Eckelman R et al, *Clin Chim Acta* 36: 517, 1972.
25. Sammon PJ et al, *Int J Appl Radiat Isot* 30: 359, 1979.
26. Nissenson RA et al, *Methods Enzymol* 109: 48, 1985.
27. Butt WR, *Clin Biochem Anal* 14:19, 1984.
28. Redshaw MR & Lynch SS, *J Endocrinol* 60: 527, 1974.
29. Reay P, *Ann Clin Biochem* 19:129, 1982.
30. Escher E, *J Recept Res* 4:331, 1984.
31. Denny JB & Blobel G, *Proc Natl Acad Sci USA* 81, 5286, 1984.
32. Odell WD, in "Principles of competitive Protein-Binding Assays" (Odell WD & Franchimont P ed.) p 69, Wiley, New York, 1983.
33. Lambert B & Jacquemin C, *Biochimie* 55: 1395, 1973.
34. Nissenson RA & Arnaud CD, *J Biol Chem* 254:1496, 1978.
35. Fenzi G & DeGroot LJ, *J Nucl Med Allied Sci* 25:11, 1981.
36. Judd RC et al, *J Liq Chromatogr* 8:1109, 1985.
37. Parker CW, in "Radioimmunoassay of Biologically Active Compounds" (Parker CW ed.) Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N. J., 1976. (有中译本)
38. Teitelbaum AP, in "Assay Calcium-Regulating Hormones" (Sikle DD ed.) p191, Springer-Verlag, New York, 1983.
39. Tower BB et al, *Methods Enzymol* 70:322, 1980.
40. Choi YS et al, *Mol Immunol* 20:1249, 1983.
41. Baldwin RW & Pimm MV, *Can Metastasis Rev* 2:89, 1983.