

蛋白质和多肽激素¹²⁵碘化的基本原理和实践

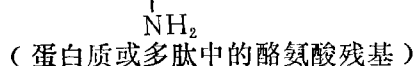
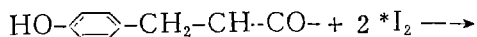
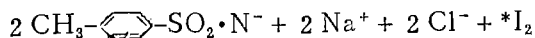
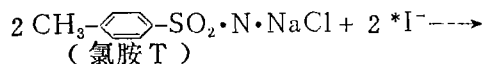
上海医科大学华山医院 林祥通综述

中国医学科学院协和医院 王世真审

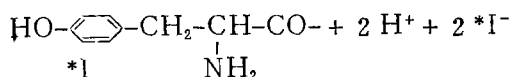
由于放射免疫分析、放射性受体分析、受体的放射测定、细胞膜结构及受体研究、单克隆抗体用于肿瘤的诊断和研究等技术相继在国内临床开展,蛋白质及多肽激素的¹²⁵碘化技术(或¹³¹碘化)在国内许多临床及基础医学实验室已普遍应用,其中仍以氯胺T法为常用,但该法显然有一定局限性。本文扼要介绍一些国外目前沿用的¹²⁵碘化新技术,着重结合国内的实践加以论证,旨在使大家对这方面的工作有一个较系统的了解,在实际工作中对某些¹²⁵碘化新技术的¹²⁵碘化程序和条件有所认识。现分述如下:

一、氯胺T法^[1~2]

国内目前仍常用。氯胺T是氧化剂,它同过氧化氢(H₂O₂),一氯化碘(ICl)一样,能使阴离子的¹²⁵I或¹³¹I氧化成带正电荷的放射性碘,然后取代蛋白质中酪氨酸分子芳香环上的氢或取代甾体A环2位上的氢,其反应如下式:



*I



蛋白质或肽类物质¹²⁵碘标记率与其分子中酪氨酸的含量以及暴露程度有关。非肽类

物质,如甾体,直接以¹²⁵I标记它A环2位上,可能会掩盖某些反映其特异功能基团,影响免疫反应的特异性。为此,一般先在甾体上接上一个酪氨酸甲酯(TME),然后再进行碘化。由于国内提供的¹²⁵碘有时含有还原剂(约含硫代硫酸钠1mg/ml),因而氯胺T和偏重亚硫酸钠的量要酌情加大。各个实验室要通过自己的实践,摸索出针对不同实验要求和不同蛋白质或多肽的最适标记条件,一般要求有适当的比放射性,尽可能使免疫及生物活性少受损伤以及一次标记后保存稳定性较好等。国内天津医学院对氯胺T¹²⁵碘化多肽激素的最佳条件作了较系统的观察研究,可资借鉴。一般说来,下列诸因素影响¹²⁵碘化结果:①¹²⁵I比放射性越高越好,最好不含还原剂和杂质;②氯胺T用量尽可能低;③反应总体积要小;④反应时间尽可能短;⑤反应液pH调至该种激素为保持其活性的最佳条件为准;⑥如标记品供放射性受体分析,则标记全过程温度不宜过高,甚至宜在0℃~4℃环境下进行。

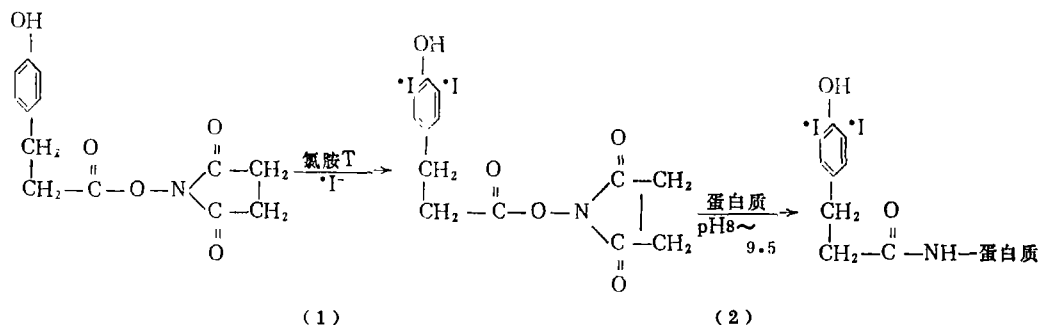
二、联结标记法^[3~4]

此法系Bolton和Hunter氏首先采用。故亦称Bolton和Hunter改良氯胺T法。基本原理是先将¹²⁵I用氯胺T法标记在酰化剂[3-(4-羟基苯)-丙酸-N-羟基琥珀酰亚胺酯]上,然后与待标记蛋白质分子上的氨基共轭结合。本法的特点是蛋白质等被标记物不直接与氧化剂和还原剂接触,避免免疫活性

注:〔*I〕代表放射性碘离子,以下均同。

和生物活性的损伤,同时也解决了某些不含酪氨酸残基和组氨酸的蛋白质或肽类的¹²⁵碘化问题,而且酰化剂可预先制备,以商品形式供临床选用(如英国Amersham公司)。但是,本法在蛋白质分子中引进一个有机分

子基团,对其免疫或生物活性有否影响?值得探索观察。此法国内使用不甚普遍,但也已用于多种蛋白质和多肽激素的¹²⁵碘化。其反应如下式:



三、酶促¹²⁵碘化法

1. 乳过氧化物酶(Lactoperoxidase, 简称LPO)法^[5~8]: 1969年, Marchalonis氏首先用此法¹²⁵碘化IgG, 现认为此法对肽类激素的¹²⁵碘化较为适用。本法较氯胺T法温和, 因而能使标记后的肽类激素保持较

好的免疫和生物活性。国内的研究也支持此观点。它的基本原理是利用酶促反应催化过氧化氢(H₂O₂)使其释放活泼的新生态氧, 后者可使¹²⁵I离子活化, 从而使它能取代蛋白质分子中酪氨酸苯环上的氢原子。其反应如下式:

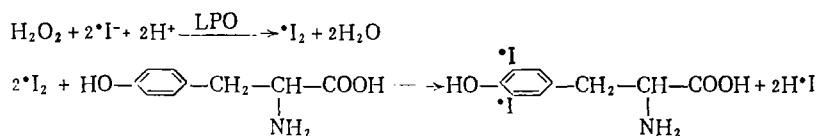


表 国内五种多肽激素LPO酶促¹²⁵碘化参考条件^[8]

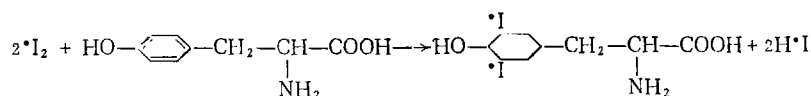
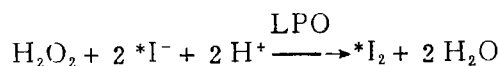
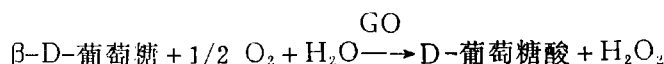
¹²⁵ I化程序 \ 多肽激素	TSH	GH	hCG	LH	FSH
激素投料量(μg/μl)	2.0/25	5.0/25	2.0/10	4.5/10	2.5/10
0.5MPB pH7.5(μl)	25	—	—	—	25
Na ¹²⁵ I(mCi/μl)	1.0/50	1.0/50	1.0/50	1.0/50	1.0/50
LPO(ng/μl)	500~1000/10	500/10	5000/10	1000/10	500/10
H ₂ O ₂ (ng/μl)	290/10	290/10	290/10	435/10	145/10
0.4MNaCA缓冲液pH5.6(μl)	25	25	25	25	25
反应时间(20~25°C室温)(分)	24	24	24	24	24
最后上柱总体积(μl)	145	120	105	105	130

¹²⁵I多肽激素与游离¹²⁵I的分离用Sephadex G25或Sephadex G50柱, 分离后可见二个放射性峰, 第一峰为¹²⁵I-多肽激素, 第二峰为游离¹²⁵I。如用于放射受体分析, 对生

物活性要求较高, 可于标记后直接用Sephadex G100柱(1×40cm)分离, 如GH、TSH等, 通过分离可得三个放射性峰, 第一峰为聚合物, 系变性部分, 免疫及生物活

性较差,第二峰为GH或TSH单体,免疫及生物活性最好,第三峰为游离 ^{125}I 。亦可使 ^{125}I -TSH或 ^{125}I -GH与相应受体结合后再行解离,达到提纯目的。 ^{125}I -胰岛素可用聚丙烯酰胺电泳法分离单碘胰岛素,用于胰岛素受体的放射测定。

2. 葡萄糖氧化酶(Glucose Oxidase,



现以HGH的 ^{125}I 化实例,说明其 ^{125}I 化程序:

HGH (0.5M PB配制)	5 μg /25 μl
0.5M PB pH7.2	25 μl
Na ^{125}I	1 mCi/10 μl
LPO(0.4M NaAC, pH5.6)	2 μg /20 μl
GO(0.1M PB, pH7.2配成 1 μg /ml溶液)	20ng/20 μl
β -D-glucose(双蒸水配成5%)	250 μg /5 μl
室温下反应 5~15分	反应总体积 105 μl
0.1M PB, pH7.2 (含0.1%叠氮钠)	100 μl 中止反应
5%BSA-PBS (0.01M, pH7.5)	200 μl
上柱总体积	405 μl
↓ SephadexG25柱分离 ^{125}I -HGH及游离 ^{125}I	

四、Iodogen标记法: [11~16]

1978年,Fraker和Speck首先应用此法。Iodogen是一种非水溶性固相氧化剂,其化学名称1, 3, 4, 6-四氯-3 α , 6 α -二苯甘脲(商品名Iodo-Gen)。一般将Iodogen溶于二氯甲烷中,然后涂在塑料管上,吹干备用。或将溶于二氯甲烷中的Iodogen在室温条件下用氮吹干,使呈片状,以使它

简称GO)法[9~10]; 1977年Tower氏首先报告。此法基本原理同LPO法,只是在反应时持续不断且有控制地产生微量 H_2O_2 ,以供LPO在催化作用时氧化[*I $^-$]成为[*I $^+$],从而完成蛋白质和多肽激素的 ^{125}I 化。其反应如下式:

作为 ^{125}I 化过程的固相氧化剂。此法可得到高比度的 ^{125}I 标记物,且使其损伤达最低限度,能保持较好的免疫与生物活性;同时标记物多为单碘化合物,因而有较好的贮存稳定性;适用范围广,除多肽激素 ^{125}I 化外,尚可用于氨基酸、嘧啶类小分子、病毒、红细胞及肿瘤细胞等的标记。现举国内TSH ^{125}I 碘化为例说明之。

Iodogen	2 μg (涂反应管)
TSH	2.5 μg /10 μl
(0.5M PB, pH7.4配制)	
Na ^{125}I	0.5~1.0mCi/10 μl
反应 5~15分钟	
0.05M PB, pH7.4	100 μl (加入反应管)
↓ 上柱SephadexG25, 分离游离 ^{125}I	
^{125}I -TSH (低温保存备用)	

五、其它 [17~18]

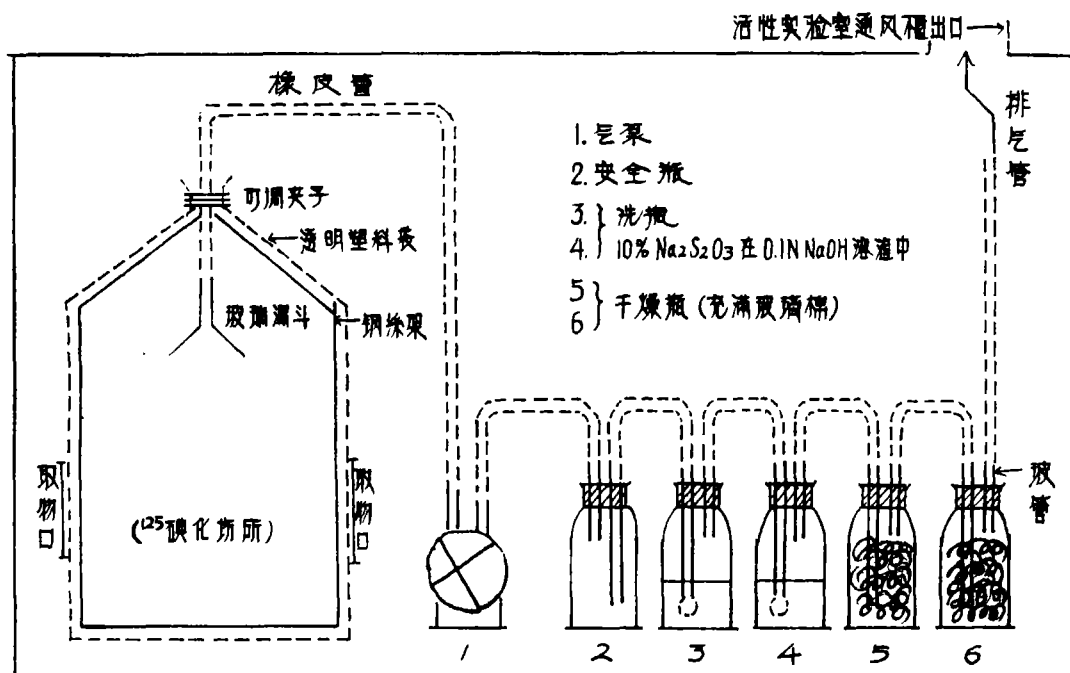
尚有电解法、氯气法、次氯酸钠法、氰化亚铜法、光解联接法等,但国内较少或很少应用,故不予赘述。值得注意:1982年,美国Pierce化学公司提供一种新型的固相催化碘化试剂(商品名Iodo-bead TM),它是无孔聚苯乙烯小球连接氯胺T衍生物-N-氯代苯磺酰胺(钠盐)。此法克服了Iodogen

法需要事先涂管的手续,应用更加简便。碘化过程中,只需控制投入的微粒数目,就可控制反应条件。Griffiths氏用此法标记AFP得到满意结果。

六、 ^{125}I 碘化过程的防护^[19]

国内一般临床核医学实验室 ^{125}I 碘化时较重视外照射的防护,但对 ^{125}I 碘吸入的防护却

重视不够。1982年,作者在日本群馬大学内分泌研究所激素测试中心研究室(主任系若林克己教授)参观和学习多肽激素 ^{125}I 碘化时,该室用很简单的设备制成标记防护罩(Radioisotope Hood),置于实验室大通风橱内,使用也比较方便。今介绍其装置简图以供参考,或许对大家在 ^{125}I 碘化过程中考虑内照射的防护时有所帮助。



附图: 蛋白质或多肽 ^{125}I (^{131}I) 化时的防护(日本群馬大学内分泌研究所)

七、蛋白质和多肽激素 ^{125}I 碘化和其它物质标记的关系^[20~22]

尽管 ^{125}I 碘在蛋白质与多肽的标记中广泛应用,但并非唯一的。其它放射性核素如 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{111}In 、 ^{90}Y 等(金属放射性核素)通过双功能试剂联结标记单克隆抗体,近年已有报告。非放射性物质如荧光素、酶、化学发光物质(Chemiluminescence)亦用于标记蛋白质和多肽激素,并建立了相应的免疫分析法。这些在单克隆抗体研究以及免疫分析中的新动向应引起重视。

参考文献

1. Hunter WM and Greenwood FC; Nature 194: 495, 1962.
2. 马丽云等; 核技术 3: 37, 1982.
3. Bolton AE and Hunter WM; Biochem J 133: 529, 1973.
4. Rudinger J and Ruegg U; Biochem J 133: 538, 1973.
5. Marchalonis JJ et al; Biochem J 113: 299, 1969.
6. Schneider B et al; Diabetes 25: 260, 1976.

7. Wajchenberg BL et al; J Nucl Med 19 : 900, 1978.
8. 林祥通等: 核技术 1 : 28, 1983.
9. Tower BB et al; Life Sci 21 : 959, 1977.
10. 林祥通等: 核技术 2 : 33, 1985.
11. Fraker PJ and Speck JC; Biochem Biophys Res Commu 80 : 849, 1978.
12. Wood WG et al; J Clin Chem Chin Biochem 19 : 1051, 1981.
13. Batler SR et al; Clin Chem 30 : 547, 1984.
14. Kleveland PM et al; Scand J Gastroenterol 20 : 569, 1985.
15. Markwell MAK and Fox CF; Biochem 17 : 4807, 1978.
16. 邓守真、林祥通: 原子能科学技术 21 (2) : 187, 1987.
17. Markweel MAK; Annal Biochem 125 : 427, 1982.
18. Lee DSC and Griffiths BW; J Immunol Methods 74 : 181, 1984.
19. 若林克己: 个别咨询, 1982.
20. Childs RL et al; J Nucl Med 26 : 293, 1985.
21. 李毕忠综述: 国外医学放射医学分册 3 : 163, 1986.
22. Schall RF and Tenoso HJ; Clin Chem 27 : 1157, 1981.

单克隆抗体与核医学

华西医科大学附一院核医学科 莫廷树综述

上海第六人民医院同位素室 马寄晓审

单克隆抗体是应用现代生物学技术, 通过杂交瘤细胞获得的有较高特异性的一种抗体。随着放射性标记技术和显象仪器的发展, 使单克隆抗体成为临床诊治疾病(特别是肿瘤的诊断)的一种最新的且最富有挑战性的诊治手段。本文就核医学中单克隆应用的有关问题综述于后。

一、有关单克隆抗体的一些基本知识

抗体或免疫球蛋白(Ig)是较高等动物的浆细胞对引入的大分子外来物质(抗原)所产生的一种反应物。当Ig与特异性抗原相结合时, 常导致产生抗原破坏或排斥的复合物的免疫反应。

同一种B淋巴细胞干的浆细胞族可产生不同的抗体。由被刺激的B淋巴细胞及其子体浆细胞的抗体被命名为多克隆抗体。如能取出单个B淋巴细胞或浆细胞并置于组织培养基中无性繁殖, 则可以用手工方式从中获取单一类型的抗体, 此即单克隆抗体。但正

常细胞产生的抗体不能在培养基中生存。

1975年, Kohler和Milstein等^[1]发现骨髓瘤细胞能产生大量相同的、但非特异性的免疫球蛋白, 而培养物中无限期生存的免疫球蛋白可以用重组密码的新技术加以改善, 以建立有用的免疫球蛋白产物即永生的克隆。

他们还发明一种以聚乙烯二醇为介质, 与鼠骨髓瘤细胞和羊红细胞免疫后的鼠新鲜脾脏的淋巴细胞相融合, 生成能产生大量代表瘤细胞系的持久性和单个脾B淋巴细胞遗传密码的“预先确定”的特异性抗体的杂交瘤细胞^[2]。这种杂交瘤细胞能选择性地存在次黄嘌呤-氨基蝶呤-胸腺嘧啶(hypoxanthine-aminopterin-thymidine)介质中生长。但此介质却不能供养未融合的淋巴细胞和骨髓瘤细胞。此方法能得到具有单一抗原特异反应的纯免疫蛋白, 即单克隆抗体。

免疫球蛋白按其结构分为IgG, IgM, IgE, IgA及IgD等五类。IgG由两条长的