

10. Dowsett DJ et al; Br J Radiol 1976, 49: 540
11. Asnis SE et al; Clin Orthop 1976, 121: 149
12. 刘尚礼等; 中华核医学杂志1986, 6(4): 211
13. Danigelis J A et al; Radiology 1975, 115: 407
14. D'Ambrosia RD et al; clin orthop 1976, 121: 143
15. 李景英等; 中华核医学杂志 1983, 3(2): 79
16. Fogelman I et al; clin Radiol 1980, 31(3): 321
17. Berggron A; J Bone Joint Surg 1982, 64 A(6): 799
18. 黄耀章等; 中华核医学杂志 1985, 5(2): 86
19. 朱保伦等; 中华外科杂志 1985, 23(1): 33
20. Howie DW et al; J Bone Joint Surg 1983, 65(A): 431,
21. Kirchner PT et al; J Bone Joint Surg 1981, 63-A(4): 673
22. 李景英等; 中华核医学杂志 1986, 6(1): 9
23. Front D et al; J Nucl Med 1978, 19(8): 916
24. Stodell MA et al; Pneumatol Rehabilitaton 1980, 19: 163
25. 菅正康等; Radioisotopes 1976, 25(11): 17
26. 陈曼; 中华核医学杂志 1984, 4(4): 193
27. 温孝恒等; 中华核医学杂志 1984, 4(4): 206

Bolton-Hunter法碘标记技术及其应用

上海医科大学中山医院 耿建国综述 上海市心血管病研究所 陈灏珠 王世真*审

1973年, Bolton和Hunter^[1]首先报告采用¹²⁵I标记的N-琥珀酰亚胺3-(4-羟基苯基)丙酸 [¹²⁵I-labeled N-succinimidyl 3-(4-hydroxyphenyl)propionate, ¹²⁵I-SHPP]来标记hGH、hTSH和hLH, 分别得到 6.3×10^6 、 4.4×10^6 、和 1.9×10^6 Bq(170、120和50 μ Ci)/ μ g的较高比放射性, 且对上述激素的免疫活性和生物学活性的影响甚微, 因此, 引起广泛的关注和兴趣^[2~3]。采用此法已经成功地标记了很多蛋白质、多肽、酶、抗体、补体、病毒、细胞、细胞膜、抗菌素和毒素等^[4]; 目前, Bolton-Hunter法已经成为医学、生物学等学科研究工作中, 一种重要的碘标记方法。

Bolton-Hunter法碘标记技术的基本原理是采用二步法, 即先用氯胺-T法将放射性碘标记在SHPP上, 然后, 再和欲标记的

蛋白质等共价联结。因此, 又称为联结标记法^[1]。此法具有反应自发进行, 条件温和, 并避免了高浓度放射性碘、氧化剂及还原剂直接和欲标记的蛋白质等接触时, 对其免疫学活性和生物学活性的影响等特点。此外, 和氯胺-T法、乳过氧化物酶法和Iodogen法在酪氨酸残基的苯环或某些组氨酸残基上发生亲电碘取代反应不同, Bolton-Hunter法主要在赖氨酸 ϵ -氨基或蛋白质的N-末端上发生亲电碘取代反应, 故当欲标记的蛋白质、多肽等缺乏酪氨酸残基或碘标记在酪氨酸残基上引起免疫学活性和生物学活性减低、甚至丧失时, 本法是一个良好的替代方法^[5]。

碘标过程:

¹²⁵I-SHPP结构式见图。

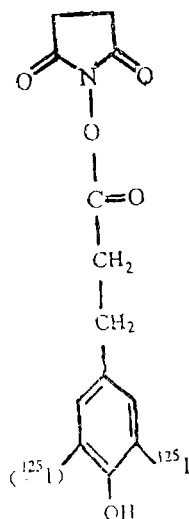
1. SHPP合成^[6]

试剂: 3-(4-羟基苯基)丙酸(HPPA)

* 北京协和医院

1.661克(10mmol), N-琥珀酰亚胺(NHS) 1.151克(10mmol), 二环己基碳二亚胺(DCC) 2.47克(12mmol), 四氢呋喃(THF), 醋酸, 乙酸乙酯, 异丙醇和石油醚。

方法: -18°C 下, 将HPPA和NHS加入7毫升THF中, 再加入DCC, 然后, -18°C 下磁搅拌2小时, 再室温下搅拌10小



时。接着, 加入0.12毫升醋酸, 破坏过量的DCC。1小时后, 加入乙酸乙酯10毫升稀释。然后, 过滤除去二环己基脲沉淀, 减压真空干燥。再加入10毫升石油醚(沸点 $45\sim 60^{\circ}\text{C}$)后, 用20毫升乙酸乙酯重结晶, 即可得产品2.51克(熔点 $120\sim 122^{\circ}\text{C}$)。虽然此时合成的SHPP已可用于碘化和偶联反应, 但仍含有少量未反应的HPPA。因此, 可在 0°C 下加水60毫升, 再用异丙醇20毫升重结晶。然后, 再减压真空干燥, 即可以得到纯品0.91克(熔点 129°C)。

2. SHPP碘化^[1]

试剂: SHPP 0.2~0.25 μg , Na^{125}I 74~185MBq/10 μl , 氯胺-T 50 μg (pH 7.5的0.25 mol/L磷酸缓冲液10~20 μl), 焦亚硫酸钠 120 μg (pH 7.5的0.05 mol/L磷酸缓冲液10 μl), KI 200 μg (pH 7.5的0.05 mol/L磷酸缓冲液10 μl), 二甲基甲酰胺(DMF)和苯(试剂纯)。

方法: 室温下将 Na^{125}I 溶液加入SHPP结晶中, 然后, 立刻加入焦亚硫酸钠、还原氧化剂和碘化物, 中止反应。接着加入载体KI, 然后先加入5 μl DMF抽提, 再用苯萃取二次。为了避免 ^{125}I -SHPP水解失活, 整个步骤必须尽快完成(< 1 分钟)。

另外, 也可以将SHPP溶解在10~20 μl 苯溶液中, 用氮气吹干, 然后依次加入 Na^{125}I 、焦亚硫酸钠和KI。其余步骤同上。此外, ^{131}I 和 ^{77}Br 标记蛋白质也取得了成功^[4]。

3. 蛋白质标记

以hGH为例^[1]。

试剂: hGH 5 μg (pH 9.5的0.1 mol/L硼酸缓冲液10 μl), ^{125}I -SHPP 0.2 μg , 0.2 mol/L甘氨酸0.5毫升溶解在pH 8.5的0.1 mol/L硼酸缓冲液中。

方法: 氮气吹干 ^{125}I -SHPP。将试管冷却到 0°C , 加入hGH溶液(0°C)。轻轻摇晃试管15分钟, 然后加入甘氨酸, 轻摇5分钟, 以便破坏未反应的酯。接着用含0.25%明胶的pH 7.5的0.05 mol/L磷酸缓冲液在 Sephadex G-50柱上进行洗脱, 将标记物和无机碘分开。值得注意的是, 由于血清白蛋白及其它血清成份能和低分子量化合物结合, 因此, 洗脱液中不可加入这类物质。

令人颇感意外的是, 有些人工合成的化合物, 可以先和SHPP酰化作用, 然后用氯胺-T法进行碘标记^[7~8]。尽管此法理论上不如上述常规方法, 但是, 采用此法标记氨基糖苷类抗菌素如庆大霉素、妥布霉素和氨基羟丁基卡那霉素等获得很大成功。例如, 采用此法碘标记庆大霉素, 其放射性高达70%, 比放射性 $4.4 \times 10^7 \text{Bq}$ (1200 μCi)/ μg , 反之, 如用常规方法的话, 其放射性少于5%, 比放射性仅 $2.7 \times 10^8 \text{Bq}$ (73 μCi)/ μg ^[7]。目前, 上述现象的原因尚未阐明^[4]。

Bolton-Hunter法碘标记技术的缺点主要是在碘标记过程中, 引入了一个较大的有机基团。因此, 对欲标记物质的免疫学和生

物学活性可能具有一定的影响。Heber等^[9]认为,由于上述原因,此法不适用于短肽的碘标记。此外,采用Bolton-Hunter法碘标记的方法较复杂,且由于需进行二次反应(二步法),故放射性获得率低于直接碘标记法^[10]。

总之,Bolton-Hunter法碘标记技术具有独特的优点,但也有缺点^[11]。和所有其它碘标记技术一样,人们应根据其特点的不同进行选择,以期达到最佳碘标记效果。

参 考 文 献

1. Bolton AE & Hunter WM; Biochem J 1973, 133:529
2. Parratt D et al; Preparation of antisera and radiolabelling. In. Radioimmunoassay of antibody and its clinical application. Ed. Parratt D P 52, John Wiley & Sons. Chichester, 1982
3. Kricka LJ. Radioimmunoassay. In. Ligand-binder assays. Labels and analytical strategies. Ed. Kricka LJ. P 113, Marcel Dekker, Inc. New York and Basel, 1985
4. Langone JJ; Methods Enzymol 1980, 70, 221
5. Butt WR; Anal Proc 1981, 18:100
6. Rudinger J & Ruegg U; Biochem J 1973, 133: 538
7. Casley DJ; Clin Exp Pharmacol Physiol 1977, 4, 525
8. Ashby CD et al; Clin Chem 1978, 24, 1734
9. Heber D et al; Clin Chem 1978, 24:796
10. Butt WR; Problems of iodination. In. Practical immunoassay. the state of the art. Ed. Butt WR. P27, Marcel Dekker, Inc. New York and Basel, 1984
11. Sturgeon CM et al; Ann Clin Biochem 1983, 20, 112

脑 的 功 能 显 像

Ell PJ et al

血脑屏障SPECT

早在1960年,就进行了穿透血脑屏障的非特异性显像——用过锝酸形式的^{99m}Tc进行脑闪烁显像。另一些^{99m}Tc标记的放射性药物,象葡庚糖酸(GH)和二乙三胺五醋酸(DTPA)可改善靶/本底比值。因而,几乎十年时间内,用这些示踪剂所进行的脑闪烁显像能发现广泛的血管性和肿瘤的病理变化。然而,还不能区分灰质和白质,因为这些示踪剂只和细胞外间室有关。

单光子发射计算机断层(SPECT)的出现刷新了对核医学中脑显像的技术。1980年首次有了三个SPECT和X线透射型计算机断层(CT)的比较性研究报道。Ell等人报道了209例脑的SPECT和X-CT比较:169例(81%)结果一致,CT假阳性率0.5%,假阴

性率6%;SPECT假阳性率0%,假阴性率对恶性肿瘤为2.4%,而血管性疾病为10%(因为陈旧性梗塞和血脑屏障不损伤者不显影)。SPECT和X-CT对新发生的血管性疾患的检出率是一致的。与平面闪烁显像比较,SPECT数据在所有情况都改善20%,它包括了灵敏度增加和定位作用的改善。

同年(1980年)稍晚,Hill等人发表了一份类似的比较研究报告。在200例患者中,SPECT的灵敏度比平面闪烁显像提高了10%多,对重叠在同一平面上的深部病变的鉴别,SPECT还改善了特异性。

亦是在1980年,Watson等人对238例患者再次比较了SPECT与平面闪烁显像。虽然在所有病例中的80%两者是一致的,但用SPECT没有明显的改进,这是与不少报告