

^{99m}Tc 标记抗 β -人绒毛膜促性腺激素单克隆抗体

薛艳 安瑞芳 喻明启 王姝 谢丽

【摘要】 目的 用 ^{99m}Tc 标记抗 β -人绒毛膜促性腺激素(β -HCG)单克隆抗体。方法 以 SnCl_2 为还原剂,采用直接标记法进行标记。结果 整个标记过程约需 1.5 h, 抗体标记率为 88.1%~97.5%, 胶体含量为 0.96%~1.27%, 游离锡含量为 1.10%~9.92%, 且抗体的生物活性未受到影响。结论 该方法简单、快速,有望用于妊娠滋养细胞疾病的放射免疫显像。

【关键词】 锡;绒毛膜促性腺激素, β 亚单位, 人;抗体, 抗独特性;同位素标记

【中图分类号】 R817.9 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1673-4114(2007)02-0068-02

Direct labeling of anti β -human chorionic gonadotropin monoclonal antibody with ^{99m}Tc

XUE Yan¹ AN Rui-fang¹ YU Ming-qi² WANG Shu² XIE Li²

(1. Department of Gynecology and Obstetrics, 2. Department of Nuclear Medicine, The First Affiliated Hospital of Medical School, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China)

【Abstract】 Objective To label the anti- β -human chorionic gonadotropin monoclonal antibody with ^{99m}Tc . **Methods** It was direct labeled using SnCl_2 as a reduction agent. **Results** The labeling procedure was finished within 1.5 hours. The labeling efficiency of the labeled anti- β -human chorionic gonadotropin monoclonal antibody was 88.1%~97.5%, ^{99m}Tc colloidal was 0.96%~1.27%, $^{99m}\text{TcO}_4^-$ was 1.1%~9.92%. And it retained its specific biological activation. **Conclusion** This direct method is simple, rapid and stable, and it hope to be used as radioimmunodiagnosis for gestational trophoblastic tumour.

【Key words】 ^{99m}Tc ; Chorionic gonadotropin, beta subunit, human; Antibody, anti-idiotypic; Isotope labeling

抗 β -人绒毛膜促性腺激素 (β -human chorionic gonadotropin, β -HCG) 单克隆抗体能够与肿瘤相关抗原进行特异性结合, 而 ^{99m}Tc 因其具有良好的核物理性质而被广泛用于肿瘤的放射免疫显像, 将抗 β -HCG 单克隆抗体与 ^{99m}Tc 结合成耦联物可用于恶性滋养细胞的导向诊断。本研究利用预锡法将 ^{99m}Tc 与抗 β -HCG 单克隆抗体进行标记, 并进行一系列鉴定, 为开展滋养细胞肿瘤的放射免疫显像奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

鼠抗 β -HCG 单克隆抗体由北京福瑞生物工程公司提供, 质量浓度为 1g/L; ^{99m}Tc 新鲜淋洗液由钼-锡发生器淋洗获得; 亚锡葡庚糖试剂盒由江苏省原子

医学研究所江原制药厂提供; ^{99m}Tc 测量仪由高新医院核医学科提供; 牛血清白蛋白由 Sigma 公司提供; 其余试剂均为国产分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 抗体的标记

改良预锡法^[1]: 用 pH 值为 5.6 的 0.05 mol/L 醋酸盐缓冲液 4ml 稀释亚锡葡庚糖试剂盒 (含有 0.08 mg SnCl_2 , 8 mg 葡庚糖酸钠), 按照亚锡葡庚糖: 抗 β -HCG 单克隆抗体的质量比为 1:40, 在单克隆抗体中加入亚锡葡庚糖溶液, 通氮气, 37℃反应 20 min; 取出部分抗 β -HCG 单克隆抗体用来标记, 剩余抗 β -HCG 单克隆抗体放置 -20℃保存。

取还原后的抗 β -HCG 单克隆抗体 100 μg , 按亚锡葡庚糖: 抗 β -HCG 单克隆抗体的质量比 1:40~1:80 加入亚锡葡庚糖溶液和 74 MBq 新鲜淋洗的 ^{99m}Tc (0.2 ml) 混匀, 37℃反应 0.5~1h。

1.2.2 纸层析法测定标记物的放化纯度

用新华滤纸一号, 分别以体积分数为 10% 的三

基金项目: 陕西省科学技术研究发展计划基金资助项目 (2003 k10-G47)

作者单位: 710061, 西安交通大学第一附属医院妇产科 (薛艳, 安瑞芳, 王姝, 谢丽); 核医学科 (喻明启)

通讯作者: 安瑞芳 (E-mail: anruifang@163.com)

氯醋酸和丙酮为展开剂测定标记率和游离 ^{99m}Tc ($^{99m}\text{TcO}_4^-$) 的含量;新华滤纸用 2% 的牛血清白蛋白预处理,以乙醇:水:氨水(浓度为 5mol/L)=2:5:1(体积比)为展开剂测定胶体含量。在所有展开体系中,当展开到 10 cm 左右,将滤纸取出,吹干,剪成 10 条,用 ^{99m}Tc 测量仪测定放射性计数,计算放化纯度。

1.2.3 标记物分子结构的鉴定

采用 6% 的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,电泳结果用考马斯亮蓝 R250 染色。

1.2.4 生物活性的测定

采用放射免疫方法测定标记物的生物活性。

2 结果

2.1 标记前抗体的检测

经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳显示,抗体纯度可见两条带,主带分子质量为 150×10^3 左右;经放射免疫法检测,抗体具有生物学活性。

2.2 放化纯度的测定

在丙酮体系中, ^{99m}Tc 标记的抗 β -HCG 单克隆抗体、 ^{99m}Tc -葡庚糖酸钠和 $^{99m}\text{TcO}_4^-$ 的 Rf 值分别为 0.0、0.0 和 0.9~1.0;在 10% 的三氯醋酸体系中,三者的 Rf 值分别为 0.0、0.7 和 0.7;在以乙醇:水:氨水(浓度为 5 mol/L)体系中,三者的 Rf 值分别为 0.8~1.0、0.0 和 0.8~1.0。

表 1 不同亚锡葡庚糖:抗 β -HCG 单克隆抗体质量比的标记率

亚锡葡庚糖:抗 β -HCG 单克隆抗体(质量比)	标记率 (%)	$^{99m}\text{TcO}_4^-$ (%)	胶体 (%)
1:40	88.81	9.92	1.27
1:60	97.60	1.10	1.30
1:80	97.15	1.89	0.96

2.3 标记后抗体的结构和生物学活性检测结果

经放射免疫学方法检测,抗体活性未受到损伤,保持着与标记前相同的免疫活性。

3 讨论

单克隆抗体作为肿瘤特异的导向载体,已被制备为多种免疫耦联物用于肿瘤的诊断、治疗及预防复发。随着 ^{99m}Tc 标记单克隆抗体技术的发展,用于膀胱癌^[2]、结肠癌^[3]的 ^{99m}Tc 放免显像已有报道。

^{99m}Tc 标记单克隆抗体的方法主要有:①通过螯合剂进行的间接标记法;②直接还原法;③利用生物素-亲和素系统进行标记。目前,通常用的是改良

Schwartz 法^[4]和预锡法^[5]。预亚锡法标记抗体时采用亚锡/邻苯二甲酸氢钾-酒石酸钾钠还原体系,室温还原抗体需 21 h。Rhodes 等^[5]用此体系对 β -HCG 单克隆抗体进行标记,标记率为 90%~93%。本法参考边惠洁等^[1]的改良预锡法,用葡庚糖酸钠替代邻苯二甲酸氢钾-酒石酸钾钠,将还原时间缩短为 30 min,简化了标记的过程。葡庚糖酸钠为碳水化合物,毒性比邻苯二甲酸氢钾、酒石酸钾钠小,可以防止 Sn 胶体、Tc 胶体及 Sn-Tc 胶体的形成,同时是弱配体转换络合剂。

本方法直接用弱酸性介质溶解亚锡葡庚糖试剂盒对抗 β -HCG 单克隆抗体进行标记,具有操作简单、标记率高、抗体活性损失小等特点。初始预锡化后的标记率达 88.1%~97.5%,可见预锡化是必须的。也有文献报道,把待标记的单克隆抗体用 pH 值为 9.3 的硼酸盐缓冲液稀释,通氮气,标记时加入 $^{99m}\text{TcO}_4^-$ 室温反应 2 h 即可^[6]。

在本研究中,通过对标记后的单克隆抗体用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,发现抗体主带的分子质量在 150×10^3 左右,与标记前相比无明显改变,未造成抗体分子的裂解,而有文献报道,用 2-巯基乙醇还原法标记抗体片段,所得标记物往往是抗体分子片段的混合物^[7]。

参考文献

- 边惠洁,陈志南,邓敬兰,等. ^{99m}Tc 标记肝癌单抗片段 Hab18F (ab^*)₂ 方法改进及放免显像实验研究. 中华核医学杂志, 1999, 19(4): 219-221.
- Wang R, Zhang C, Yu L, et al. Clinical application of radioimmunoinaging with ^{99m}Tc -BDI-1 in the diagnosis of bladder cancer. Chin Med J (Engl), 2000, 113(5): 396-399.
- Oliva JP, Pimentel G, Borron M, et al. Pilot study with the monoclonal antibody IOR-C5 as a potential agent of radioimmunoscintigraphy in colorectal cancer. Rev Esp Med Nucl, 2001, 20 (4): 282-288.
- Alauddin MM, Khawli LA, Epstein AL. An improved method of direct labeling of monoclonal antibodies with ^{99m}Tc . Int J Radiat Appl Instrum B, 1992, 19(4): 445-454.
- Rhodes BA, Zamora PO, Newell KD, et al. Direct ^{99m}Tc labeling of murine monoclonal antibody fragments. J Nucl Med, 1986, 27(5): 685-693.
- 张金赫,徐海峰,邵秋菊,等. ^{99m}Tc 直接法标记血管抑素. 第四军医大学学报, 2003, 24(23): 2189-2192.
- Griffiths GL, Goldenberg DM, Jones AL, et al. Preparation of a pure ^{99m}Tc -F(ab^*)₂ radioimmunoconjugate by direct labeling methods. Nucl Med Biol, 1994, 21(4): 649-655.