

离心超滤法测定蛋白质标记物的放射化学纯度

张云艳¹, 万建美¹, 钱晓敏², 郭 萍¹, 朱 然¹, 张友九¹

1. 苏州大学 医学部 放射医学与防护学院, 江苏省放射医学与防护重点实验室, 江苏 苏州 215123

2. 苏州大学 卫生与环境技术研究所, 江苏 苏州 215123

摘要: 用高效液相色谱法(HPLC)、三氯醋酸(TCA)沉淀法和超滤法分离测定¹²⁵I-AAFP(抗过敏融合蛋白)标记物的放射化学纯度(RCP), 并对其进行比较。结果表明: 三种方法均能有效分离标记物和游离碘, 用超滤法、TCA 沉淀法和 HPLC 三种方法测定¹²⁵I-AAFP 低、中、高放射化学纯度, 样本的 RCP 分别为 $0.62\% \pm 0.21\%$ 、 $7.25\% \pm 1.38\%$ 、 $0.97\% \pm 0.12\%$ 、 $61.58\% \pm 0.52\%$ 、 $63.18\% \pm 1.98\%$ 、 $63.77\% \pm 1.23\%$ 、 $98.89\% \pm 0.31\%$ 、 $98.76\% \pm 0.41\%$ 、 $98.80\% \pm 0.82\%$ 。当 RCP 很低时, 超滤法与 HPLC 法测得的 RCP 间无明显差异($P > 0.05$), 而要低于 TCA 沉淀法($P < 0.05$); 除此之外, 三种方法无明显差异($P > 0.05$)。这说明离心超滤法可用于分离测定蛋白质标记物的放射化学纯度。

关键词: 放射化学纯度; 高效液相色谱法; 三氯醋酸沉淀法; 离心超滤法

中图分类号: O658 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-9950(2016)05-0317-04

doi: 10.7538/hhx.2016.38.YX.2016061

Determination on Radiochemical Purity of Labelled Protein With Centrifugal Ultrafiltration

ZHANG Yun-yan¹, WAN Jian-mei¹, QIAN Xiao-min²,
GUO Ping¹, ZHU Ran¹, ZHANG You-jiu¹

1. School of Radiation Medicine and Protection (SRMP), Medical College of Soochow University,
Jiangsu Province Key Laboratory of Radiation Medicine and Protection, Suzhou 215123, China;

2. Sanitation & Environment Technology Institute, Soochow University, Suzhou 215123, China

Abstract: To explore the determination of radiochemical purity (RCP) of labelled protein with centrifugal ultrafiltration, the radiochemical purity of ¹²⁵I-AAFP (anti-allergy fusion protein) was determined and compared by high performance liquid chromatography (HPLC), trichloroacetic acid (TCA) precipitation and centrifugal ultrafiltrations. It shows that three methods can separate the labelled ¹²⁵I-AAFP and free iodine-125 efficiently. The lower, middle and higher radiochemical purity of ¹²⁵I-AAFP which are determined by centrifugal ultrafiltration, TCA and HPLC respectively are $0.62\% \pm 0.21\%$, $7.25\% \pm 1.38\%$ and $0.97\% \pm 0.12\%$; $61.58\% \pm 0.52\%$, $63.18\% \pm 1.98\%$ and $63.77\% \pm 1.23\%$; $98.89\% \pm 0.31\%$, $98.76\% \pm 0.41\%$ and $98.80\% \pm 0.82\%$. When RCP of ¹²⁵I-AAFP is very lower, the RCP

收稿日期: 2016-05-31; **修订日期:** 2016-07-26

基金项目: 青年科学基金资助项目(81302383)

作者简介: 张云艳(1990—), 女(彝族), 江苏宿迁泗洪人, 硕士, 流行病与卫生统计学专业

measured with HPLC is not different from that with centrifugal ultrafiltration ($P > 0.05$), whereas lower than that with TCA ($P < 0.05$). Except this, there are no significant differences in the RCP of ^{125}I -AAFP determined with three different methods ($P > 0.05$). Centrifugal ultrafiltrations can be used to determinate the radiochemical purity of labelled protein.

Key words: radiochemical purity(RCP); high performance liquid chromatography(HPLC); trichloroacetic acid(TCA) precipitation; centrifugal ultrafiltration

放射化学纯度(radiochemical purity, RCP)是衡量放射性标记物质量的重要指标之一,直接影响核医学的实验研究和临床使用效果,常用的分离方法有纸色谱法、三氯醋酸(trichloroacetic acid precipitation, TCA)沉淀法、电泳法、高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)等。对某些特殊理化性质的放射性标记物也可采用其他分离分析方法,如过滤法、离心法^[1]。目前,离心超滤法广泛用于蛋白质的浓缩。本实验拟采用高效液相色谱法(HPLC)、三氯醋酸(TCA)沉淀法和离心超滤法测定 ^{125}I -AAFP(抗过敏融合蛋白, anti-allergy fusion protein)标记物的放射化学纯度,以探讨离心超滤法分离测定蛋白质标记物 RCP 的可行性。

1 实验部分

1.1 仪器与材料

2695 型高效液相色谱仪、Waters 2674 型紫外分光检测器、PROTEIN PAKTM 300SW 型凝胶柱,美国 Waters 公司;LB509 型放射性检测器,德国 Berthold 公司;GC-1200 γ 放射免疫计数器,中国科技大学中佳光电仪器公司;LGIO-3A 高速冷冻离心机,北京医用离心机厂;XY-1 型低压吸引器,上海合力医疗器械厂;XW-80A 旋涡混合器,上海琪特分析仪器有限公司。

^{125}I -NaI,上海欣科同位素公司;100 kDa 超滤离心管,美国 Millipore 公司;Sephadex G50, Pharmacia 公司;牛血清白蛋白(BSA),美国 Sigma 公司;AAFP(抗过敏融合蛋白, 14.9 g/L, 每支 15 mL),上海富绅科芯生物技术股份有限公司;其余试剂均为国产分析纯试剂。

1.2 实验方法

1.2.1 ^{125}I -AAFP 的制备 ^{125}I -AAFP 采用氯胺 T 法标记。取 30 μL AAFP 原液(14.9 g/L)至 1.5 mL 的 Eppendoff 管中,分别加入 20 μL 0.2 mol/L pH=8.0 磷酸盐缓冲溶液和 25 μL Na^{125}I ($\approx 5\text{ mCi}$, $1\text{ Ci}=3.7\times 10^{10}\text{ Bq}$)溶液,混匀,

加入 10 μL 5 g/L 氯胺 T 溶液,混匀器上室温下反应 1 min,然后加入 20 μL 偏焦亚硫酸钠溶液(5 g/L),继续作用 5 min,然后用 Sephadex G50 凝胶柱分离纯化,淋洗液为 20 mmol/L pH=7.6 $\omega(\text{BSA})=0.2\%$ PBS 缓冲溶液,每管收集 0.5 mL 淋洗液,活度计测每管淋洗液的放射性,TCA 沉淀法测纯化后第 2 管淋洗液放射化学纯度为 98.7%,备用。

1.2.2 放化纯度的测定

1) 待测标记物的准备

^{125}I -AAFP 的 3 个不同放化纯度的样本;其中样本 1 为纯化后的 ^{125}I -AAFP,高放化纯度样本;样本 2 为游离的 ^{125}I -NaI 直接加入适量未标记的 AAFP,低放化纯度样本;样本 3 为纯化后的 ^{125}I -AAFP 与游离 ^{125}I -NaI 按 2:1 比例混合配制放化纯度约为 65% 的样本,中放化纯度样本。为保证放射性计数测量准确性,针对不同测量仪器,将样本用生理盐水稀释到合适的放射性浓度。每种分离方法测定放化纯度设 3 个平行样。

2) HPLC 法

^{125}I -AAFP 采用 PROTEIN PAKTM 300SW 凝胶柱分离,流动相为 0.01 mol/L 的 pH=6.5 的磷酸盐缓冲溶液(PBS),流速为 0.8 mL/min,进样量 10 μL (约 $5\times 10^5\text{ min}^{-1}$),且同时用紫外分光($\lambda=280\text{ nm}$)检测器和放射性检测器检测。紫外分光检测器主要确认保留时间,放射性检测器测定放射性水平。由放射性图谱计算 ^{125}I -AAFP 的放化纯度:RCP=标记物峰面积/(标记物峰面积+游离碘峰面积) $\times 100\%$ 。

3) TCA 沉淀法^[2]

取标记物 10 μL (约 $5\times 10^4\text{ min}^{-1}$),再加 80 g/L 牛血清白蛋白溶液 10 μL 、生理盐水 180 μL 、20% TCA 200 μL , γ 放射免疫计数器测量总放射性,4 000 r/min 离心 10 min 后,弃上清液后再测量沉淀的放射性。放化纯度计算:RCP=(沉淀的计数率/总计数率) $\times 100\%$ 。

4) 超滤离心法

取标记物 100 μL (约 $5 \times 10^4 \text{ min}^{-1}$) 加入超滤离心管的滤膜上, γ 放射免疫计数器测量离心前放射性; 4 000 r/min 离心 10 min, 500 μL 生理盐水洗三次后, γ 放射免疫计数器测量离心后放射性。计算放化纯度: $\text{RCP} = (\text{离心后放射性计数率} / \text{离心前放射性计数率}) \times 100\%$ 。

1.3 统计学分析

采用 SPSS13.0 统计软件做 t 检验, 数据均以均值 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 统计学检验以 $P < 0.05$ 为有显著性意义。

2 结果与讨论

2.1 HPLC 分离

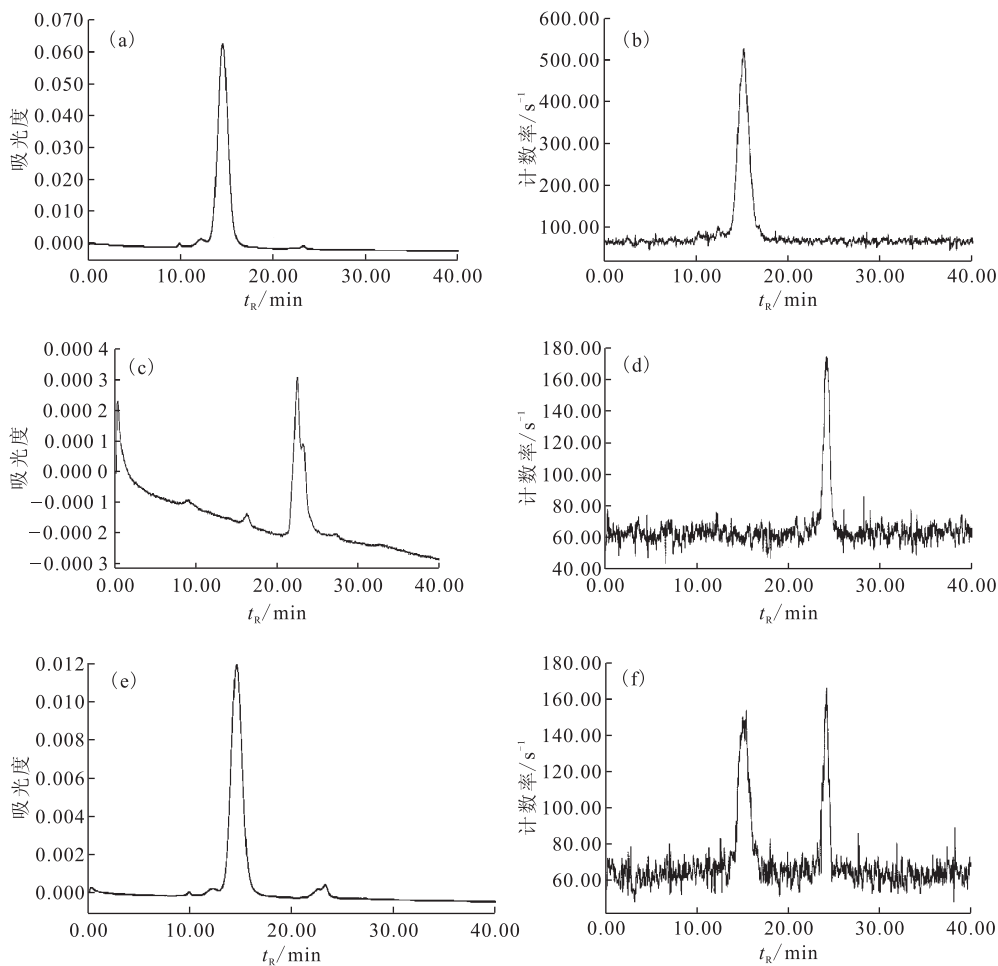
蛋白质标记物的放化纯度测定的常用方法有纸层析法、三氯醋酸 (TCA) 沉淀法、薄层层析法、

电泳法、高效液相色谱法 (HPLC) 等。HPLC 因其分离效果好, 常用于多肽和蛋白质标记物的分离测定, 但此法的费用和技术要求相对高, 且配备的放射性检测器的灵敏度低, 限制了其应用^[3]。

3 种不同放化纯度样品分别经 PROTEIN PAKTM 柱分离, 其 HPLC 紫外和放射性谱图示于图 1。从图 1 可以看出, ^{125}I -AAFP、 ^{125}I -NaI 在紫外和放射性检测器的保留时间 (t_R) 分别为 (14.54 ± 0.24) 、 (23.85 ± 0.22) min 和 (15.82 ± 0.06) 、 (24.32 ± 0.03) min。由图 1(e, f) 可见, HPLC 能有效地分离 ^{125}I -AAFP 和游离碘, 它们的保留时间与图 1(a, b, c, d) 一致。

2.2 放化纯度

HPLC、TCA 沉淀法和离心超滤法三种不同方法测定 3 种不同放化纯度样品的放化纯度结果列于表 1。选用不同类型凝胶色谱柱的 HPLC 可



(a, c, e)——紫外谱图, (b, d, f)——放射性谱图; (a, b)——样本 1, (c, d)——样本 2, (e, f)——样本 3

图 1 样本 1、2、3 的 HPLC 谱图
Fig. 1 HPLC spectra of sample 1, 2, 3

有效分离蛋白质和游离的放射性核素,是目前公认的放射化学纯度分离测定的精确可信的分析方法。实验结果表明,TCA 沉淀法分离测定蛋白质标记物(¹²⁵I-AAFP)的放射化学纯度,在高、中放化纯度时,与 HPLC 法无显著性差异($P>0.05$),而在低放化纯度时,与 HPLC 法有显著性差异,这主要是由游离放射性核素在蛋白质中非特异性吸附造成的。TCA 沉淀法也是一种重现性和精密度较高的蛋白质分离方法,且简便、快速、易行,但对于其他放射性标记物,此方法行不通^[4]。超滤是指在对溶液施加一定的压力后,高分子物质就被超滤管中膜所截留,而水和低分子物质透过滤膜的过程^[5]。离心超滤法分离测定放化纯度不会受放射性标记物种类的限制,分离分子量相差较大的物质效果较好,并且非特异性结合也很低。只要选择合适截留分子量的超滤管,就能有效分

离测定放射化学纯度。文献[6]中放射性¹²⁵I 标记的纳米粒子就是用离心超滤法进行放射化学纯度测定的。利用离心超滤法测定大分子标记物放射化学纯度是一种可行的方法。

3 结 论

离心超滤法分离测定蛋白质标记物(¹²⁵I-AAFP)的放射化学纯度,在高、中、低放化纯度都与 HPLC 法一致,无显著性差异($P>0.05$)。因此离心超滤法可用于分离测定蛋白质标记物的放射化学纯度。

参考文献:

[1] 范我,强亦忠.核药教程[M].哈尔滨:哈尔滨工程大学出版社,2007:87.

[2] 侯丽娜.慢性心力衰竭尿液蛋白标记物的筛选、鉴定及应用研究[D].广州:南方医科大学,2013.

[3] 郭立安.高效液相色谱法纯化蛋白质理论与技术[M].西安:陕西科学技术出版社,1993:96.

[4] 杨科亚,范我,张友九,等.¹²⁵I-TOC 和¹²⁵I-F-PGA 放射化学纯度的测定[J].核化学与放射化学,2006,28(2):105-110.

[5] 谭仁祥.植物成分分析[M].北京:科学出版社,2002:559-560.

[6] Yang K, Wan J M, Zhang S, et al. *In vivo* pharmacokinetics, long-term biodistribution, and toxicology of PEGylated graphene in mice[J]. ASC Nano, 2011, 5(1): 516-522.

表 1 3 种方法测定的¹²⁵I-AAFP 放化纯度
Table 1 Determination of RCP of ¹²⁵I-AAFP with three different methods

样本	RCP/%		
	HPLC	TCA 沉淀法	离心超滤法
1	98.80±0.82	98.76±0.41	98.89±0.31
2	0.97±0.12	7.25±1.38 ¹⁾	0.62±0.21
3	63.77±1.23	63.18±1.98	61.58±0.52

注:1) 与 HPLC 法比较 $P<0.05$