

文章编号 : 0253-9950(2003)01-0049-03

用生物素-亲和素系统测定 放射性标记生物物质的活性

范 我¹, S. Guhlke², 钱建华¹, 朱本兴¹, H. Biersack²

1. 苏州大学 核医学研究所, 江苏 苏州 215007

2. 德国波恩大学 核医学院

摘要: 分别用¹³¹I 和¹⁸⁸Re 标记亲和素, 测定其与生物素结合的能力, 并与未标记的亲和素、罗丹明标记的亲和素进行比较, 测定标记亲和素与生物素结合曲线和半解吸量; 探讨用生物素-亲和素系统测定放射性核素标记生物物质活性的可能性。结果表明, 未标记的亲和素、罗丹明标记亲和素、¹⁸⁸Re 亲和素和¹³¹I 亲和素, 它们与生物素的结合能力依次下降, 与生物素半解吸量分别为 21.9, 19.5, 25.7 和 47.9 μg; 放射性标记的亲和素与生物素结合的能力低于未放射性标记的亲和素和罗丹明-亲和素。由此推测, 有可能用亲和素-生物素系统来评价标记方法对生物活性的影响。

关键词: 亲和素-生物素系统; 放射性标记; ¹³¹I 和¹⁸⁸Re; 标记活性

中图分类号: R811.3 **文献标识码**: A

放射性核素标记的单克隆抗体、多肽、激素等生物活性分子用于核医学诊断和治疗的研究已开展多年。在使用放射性核素标记的生物制品中的关键问题之一是标记物免疫活性的测定, 特别是评价方法。标记物的免疫活性关系到生物分子的靶向性和特异性^[1,2]。通常, 生物活性物质如蛋白质、抗体、多肽等需用抗原结合试验、测定受体-配体的亲和性等方法来鉴定它们被放射性核素标记后的活性变化, 但其前提是必须首先找到与标记物能特异结合的抗原和受体, 这在一定程度上给活性测定带来了不便。

生物素-亲和素系统是一种新型的生物反应放大系统, 生物素(Biotin, Bt) 又称辅酶 R 或维生素 H, 有 β 、 γ 两种结构, 每个 IgG 分子可标记数十个用化学方法活化的生物素分子。亲和素(Avidin, Av) 是一种糖蛋白, 又称抗生物素蛋白或抗生物素, 它由 4 个相同的、含 128 个氨基酸的亚基组成, 亚基之间通过二硫键连接, 每个亲和素分子

可以结合 4 个生物素分子。Bt 和 Av 结合显示高度的亲和性与特异性, 它们一旦结合后, 很难分离。只有当 Bt 或 Av 的活性受到损伤时, 其结合才会下降。为此, Av-Bt 系统广泛应用于生物分析的诸多方面。本工作拟利用定量测定放射性标记 Av 与 Bt 的结合来探索它与标记物免疫活性的关系, 从而对各种标记方法进行比较和评价。¹³¹I 和¹⁸⁸Re 均为放射性核素靶向性治疗肿瘤中的常用核素, 它们标记单抗和肽类的活性受到普遍关注^[3,4], 因此本文选择¹³¹I 和¹⁸⁸Re 进行实验, 并对各种方法和各种核素的标记物进行比较。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

1.1.1 试剂 所有化学试剂均为分析纯或光谱纯。生物素、亲和素和罗丹明-亲和素均购自美国 Pierce 公司。生物素容量为每毫升生物素(Bt) 可结合 2 mg 亲和素(Av), 罗丹明-亲和素纯度 98.5%,

收稿日期: 2002-06-11; 修订日期: 2002-09-05

作者简介: 范 我 (1941—), 女, 浙江杭州人, 研究员, 放射化学专业。

PD-10(Sephadex G25)柱((ϕ)10 mm \times 100 mm), 购自瑞典 Pharmacia 公司, ^{188}W - ^{188}Re 发生器购自美国橡树岭国家实验室,用文献[5]报道的 Ag 阳离子/阴离子串列方法进行浓缩和纯化。 ^{131}I -NaI, 无载体,无还原剂,购自比利时 MDS Nordion S. A. 公司。

1.1.2 仪器 UV-210A 型紫外-可见扫描分光光度计,日本 SHIMADZU 科学仪器公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 ^{131}I 亲和素标记 用改进的氯甘脲(Iodogen)法^[6]标记。 ^{131}I -NaI 用胍预处理,以保证 ^{131}I 处于还原态,Iodogen 预先涂渍在氧化铝上(每毫克 Al_2O_3 涂 2 μg Iodogen),吹干待用。将 100 μg Av, 3.7 MBq ^{131}I -NaI 加入到 10 μg Iodogen 中,反应 2 min,弃去 Al_2O_3 固体物,溶液用 PD-10 柱纯化,以 pH 为 7.5 的 0.05 mol/L 磷酸缓冲液淋洗,流速 0.5 mL/min,收集第一淋洗峰为纯化的 ^{131}I -Av,放射化学纯度达 97%。

1.2.2 ^{188}Re 亲和素标记 ^{188}Re -Av 用直接标记法得到。将 4 mg 抗坏血酸加入至含 100 μg Av 的 0.1 mol/L 醋酸缓冲液中(pH = 5.0),室温下反应 30 min,加入含 2 mg $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 的 0.3 mol/L 葡萄糖酸钠溶液和 3.7 MBq ^{188}Re -NaRe- O_4 ,室温下反应 2 h。放射化学纯度达 95%以上。

1.2.3 生物素-亲和素结合率的测定 (1)将 25 μL Bt(结合容量为 50 μg Av)与 0.5 mL Sephadex G25 均匀混合,装载入柱((ϕ)8 mm \times 6 mm),用 0.1 mol/L NaHCO_3 平衡,待用。

(2)将 ^{131}I 、 ^{188}Re 或罗丹明标记的 Av 分成若干等份(每份 Av 为 6 μg),分别与 0~500 μg 不同量未标记的 Av(冷 Av)均匀混合,加入上述生物素柱,用 0.1 mol/L NaHCO_3 淋洗。在 ^{131}I -Av 和 ^{188}Re -Av 实验中,用 γ -免疫计数器的 ^{131}I 档和 ^{188}Re 档分别测定上柱前后洗脱液中或残留在柱上的 ^{131}I 或 ^{188}Re 放射性计数,计算柱上被结合的放射性百分数,得到 Av 与 Bt 的结合率;罗丹明标记的 Av 和未标记 Av 实验中,用扫描紫外-可见分光光度计测量上柱前后洗脱液的吸收曲线,通过计算吸收峰在 $\lambda = 280$ nm(亲和素)和 555 nm(罗丹明)处的吸光度,得到 Av 和 Bt 的结合率 $Y = N_{\text{柱}}/N_{\text{总}}$ 。式中, $N_{\text{柱}}$ 为 ^{131}I -Av, ^{188}Re -Av,罗丹明-Av 分别与柱上 Bt 的结合量, $N_{\text{总}}$ 为初始未与 Bt 结合的 ^{131}I -Av, ^{188}Re -Av,罗丹明-Av 的总量。

(3)用不加 Bt 的柱与非标记或标记的 Av 结合(不加冷 Av),以测定 Av 与 Sephadex G25 的非特异性结合,上述 Av 与 Bt 结合率减去 Sephadex G25 的非特异性结合部分,得到 Av 与 Bt 的净结合率。

2 结果和讨论

(1)以柱上 Av 与 Bt 的净结合率与冷 Av 质量的对数作图并示于图 1。由图 1 可见,不加冷 Av 时,标记的 Av 远低于柱上 Bt 的饱和结合容量,标记的 Av 大部分被吸附在生物素柱上。未标记的 Av,罗丹明-Av, ^{131}I -Av, ^{188}Re -Av 在柱上的初始结合率分别为(93.0 \pm 13.3)%,(79.3 \pm 9.3)%,(44.5 \pm 7.1)%和(61.3 \pm 10.6)%。其中以未标记的 Av 结合率最高,标记的 Av 初始结合率均低于前者,以 ^{131}I -Av 的初始结合率最低,为 44.5%。从图 1 还可看出,随着加入冷 Av 量的增加,各种标记的 Av 与 Bt 的结合率逐渐下降。当加入的冷 Av 超过 Bt 的饱和结合容量时,所有的标记物均被淋洗下来。从曲线可计算出未标记的 Av,罗丹明-Av, ^{131}I -Av, ^{188}Re -Av 在柱上被淋洗一半时相应的冷 Av 量(半解吸量),分别为 21.9,19.5,47.9 和 25.7 μg 。除了 ^{131}I -Av 外,其它 3 种 Av 的半解吸量比较接近。

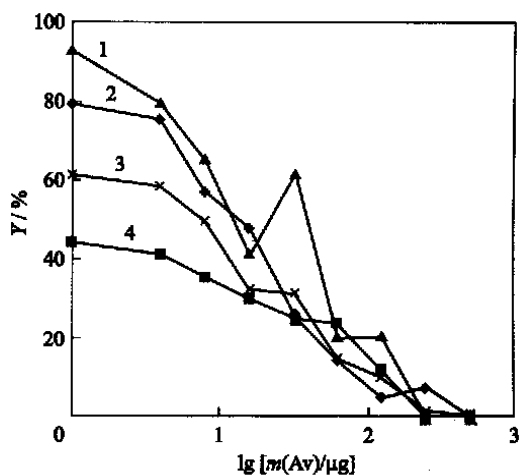


图 1 冷亲和素的质量对柱净结合率的影响

Fig. 1 Influence of cold avidin mass on net combine rate of the column

1 ——亲和素(Avidin), 2 ——罗丹明(Rhodam)-Av, 3 —— ^{188}Re -Av, 4 —— ^{131}I -Av

Av 被标记后,与未标记的 Av 相比,其初始结合率下降,而半解吸量增加。说明 Av 活性受

到损伤。标记方法和标记物质不同,损伤程度也有差异。 ^{188}Re 直接标记是通过打开 Av 上的二硫键把 ^{188}Re 结合到 Av 上, ^{131}I 则标记在 Av 的酪氨酸残基上^[7],这也许是造成对标记分子的损伤程度不同的原因。放射性标记的 ^{131}I -Av 和 ^{188}Re -Av 与 Bt 结合率比罗丹明标记的 Av 低,表明放射性核素的辐射对 Av 的活性也有影响。但因 ^{131}I 和 ^{188}Re 对生物体的辐射损伤与其吸收剂量有关,因此本实验中射线的影响难以比较。虽然 ^{131}I -Av 的初始结合率低于 ^{188}Re -Av,却并不能证明 ^{131}I 对 Av 辐射损伤大于 ^{188}Re 。

(2) 亲和素 Av 在柱上与 Bt 达到饱和结合的最大量为 $50\ \mu\text{g}$ 。当冷 Av 大于 $50\ \mu\text{g}$ 时,Av 与 Bt 的结合率将急剧下降。从图 1 可以看出,未标记的 Av 和罗丹明-Av 曲线在 $50\ \mu\text{g}$ 处有一拐点。但是对于放射性标记的 Av 与 Bt 的初始结合率明显低于非标记 Av,因此当冷 Av 的量达到饱和后,显示出结合率曲线呈缓慢下降趋势,拐点不明显。当冷 Av 量大大超过 Bt 饱和结合量时,各种标记的和非标记的 Av 与 Bt 的结合率差别越来越小。因此反映标记方法和标记物质对 Av 活性影响的主要指标是 Av 与 Bt 的初始结合率和半解吸量,通过比较它们之间的差别,有可能评价各种放射性核素标记蛋白质的方法,特别是生物活性受损程度。

3 结 论

(1) 被标记的 Av 与 Bt 结合能力低于未标记的 Av,而放射性标记的 Av 与 Bt 结合能力又低于罗丹明-Av,而半解吸率高于后者。说明标记后 Av 活性受到不同程度的损伤,且放射性标记的

Av 其活性损伤大于非放射性标记的 Av。

(2) Av-Bt 系统有可能用来评价标记方法对生物活性的影响。

参考文献:

- [1] SEATZ U, NEUMAIER B, GLATTING G, et al. Preparation and Evaluation of the Rhenium-188-Labeled Anti-NCA Antigen Monoclonal Antibody BW 250/183 for Radioimmunotherapy of Leukaemia [J]. Eur J Nucl Med, 1999, 26: 1 265 ~ 1 273.
- [2] BLAUENSTEIN P, LOCHER J T, SEYBOLD K, et al. Experience With the Iodine-123 and Technetium-99m Labeled Anti-Granulocyte Antibody Mab47: a Comparison of Labeling Methods [J]. Eur J Nucl Med, 1995, 22: 690 ~ 698.
- [3] GOLDENBERG D M. Targeted Therapy of Cancer With Radiolabeled Antibodies [J]. J Nucl Med, 2002, 43: 693 ~ 713.
- [4] WALDHERR C, PLESS M, MAECKE H R, et al. Tumor Response and Clinical Benefit in Neuroendocrine Tumors After $7.4\ \text{GBq}\ ^{90}\text{Y-DO-TATOC}$ [J]. J Nucl Med, 2002, 43: 610 ~ 616.
- [5] KNAPP Jr. F F, GUHLKE S, BEETS A L, et al. Endovascular Beta Irradiation for Prevention of Restenosis Using Solution Radioisotopes Pharmacologic and Dosimetric Properties of Rhenium-188 Compounds [J]. Card Rad Med, 1999, 1: 86 ~ 97.
- [6] SARTOR J, GUHLKE S, TENTLER M, et al. A Simple and Efficient Method for Purification and Reduction of Radioiodine for Radiopharmaceutical Syntheses [J]. J Nucl Med, 1998, 39(s): 1 439 ~ 1 441.
- [7] 王浩丹,周 申,主编.生物医学标记示踪技术 [M]. 北京:人民卫生出版社,1995.

REACTIVITY COMPARISON OF BIOLOGICAL MATERIAL AFTER RADIOLABELING WITH AVIDIN-BIOTIN SYSTEM

FAN Wo¹, GUHLKE S², QIAN Jian-hua¹, ZHU Ben-xing¹, Biersack H²

1. School of Nuclear Medicine, Suzhou University, Suzhou 215007, China

2. Clinic and Polyclinic for Nuclear Medicine, University Bonn, Germany

(下转第 60 页, Continued on page 60)

- [3] 焦荣洲,宋崇立. 溶剂萃取法处理高放废液过程中防止形成第二有机相的技术[J]. 原子能科学技术, 2000, 34(6): 553 ~ 556.
- [4] 李述文,范如霖,编译. 实用有机化学手册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1981. 345.
- [5] 孙国新. 酰胺萃取铀()-钍()体系的物理化学[D]. 上海:中国科学院上海原子核研究所,1998,13 ~ 18.
- [6] 董灵英. 铀的分析化学[M]. 北京:原子能出版社, 1991. 65.
- [7] 韩景田. N-酰化吡咯烷萃取铀()的物理化学研究[D]. 上海:中国科学院上海原子核研究所,2000,18 ~ 26.
- [8] 余仲建,李松兰,张殿坤. 现代有机分析[M]. 天津:天津科学技术出版社,1994. 374.
- [9] 宁永成. 有机化合物结构鉴定与有机波谱学[M]. 北京:北京科学出版社,2001. 489.

SYNTHESIS OF AMPHL AND STUDY ON THE INFLUENCE MOLECULE STRUCTURE CHANGE ON THE CAPABILITY OF SOLVENT EXTRACTION OF U()

HUANG Wei¹, CAO Weir-guo^{1,2}, BAO Bo-rong^{1,2}, YANG Xing-cun², LI Yi-hao²

1. Department of Chemistry, Shanghai University, Shanghai 200436, China

2. Shanghai Institute of Nuclear Research, the Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201800, China

Abstract: New extractants LMPHL, DMPHL, OMPHL are synthesized and their structures are identified by IR, ¹H NMR and EA. The influence of molecule structure change on the capability of solvent extraction of U() has been studied. The distribution ratio of U() is different because of the different length of the carbon chain on the acyl moiety. The sequence of the extraction ability increases in the order of OMPHL < LMPHL < DMPHL and the extraction mechanism of these extractants for U() extraction is proposed to be the same.

Key words: U(); LMPHL; DMPHL; OMPHL; synthesis; solvent extraction

(上接第 51 页, Continued from page 51)

Abstract: To find a method for determining the immunoreactivity of monoclonal antibodies after radiolabeling avidin is unlabeled and labeled with Rodamine, ¹³¹I and ¹⁸⁸Re, respectively. The affinities and half-disorbed amounts of biotin and four kinds of avidin are determined by the biotin columns plus non-labeled avidin (cold avidin). The affinities of biotin and avidin unlabeled and labeled with Rodamine, ¹⁸⁸Re and ¹³¹I are decreased in turn. Their half-disorbed amounts from biotin are 21.9, 19.5, 25.7 and 47.9 μg of cold avidin. Two kinds of radiolabeled avidin have lower affinity with biotin than that of avidin unlabeled and labeled with Rodamine. There is a possibility to evaluate the reactivity of biological materials with different labeling methods by avidin-biotin system.

Key words: avidin-biotin system; radiolabel; ¹³³I; ¹⁸⁸Re; immunoactivity