维普资讯 http://www.cqvip.com

局解手术学杂志 2006年第15卷第2期
J Regional Anat & Operative Surg, 2006, Vol. 15, No. 2

Iodogen 法^{131}I 标记抗 IGF1R 单克隆抗体 1H7 及产物性质鉴定

罗朝学，刘开元，程绍均，李前伟 （第三军医大学附属西南医院核医学中心，重庆 400038）

［摘 要］ **目的** 探讨放射性碘标记抗 IGF1R 单克隆抗体 1H7 的实验条件及其性质。**方法** ^{131}I-1H7 采用 Iodogen 法标记，Sephadex G-50 层析柱分离纯化；纸层析测标记物放射化学纯度（RCP），分别置于室温、4 ℃、-20 ℃，于第 8 d、16 d、24 d 测定各自 RCP，评价其体外稳定性，以竞争结合法鉴定其生物学性质。**结果** ^{131}I 标记率为 64.6 %，^{131}I-1H7 放射性比活度 5.48 MBq/μg，RCP 96.42%，即使在室温放置 24 d 后 RCP 仍达 91.8%；^{131}I-1H7 与 $HepG_2$ 细胞结合的亲和常数 K 值为 1.81×10^{11} L/mol。**结论** Iodogen 法^{131}I 标记 1H7，所得产物放射化学纯度及放射性比活度高，体外稳定，生物活性保持完好，为进一步研究奠定了基础。

［关键词］ IGF1R；单克隆抗体；碘放射性同位素
［中图分类号］ R445.4；Q813.2 ［文献标识码］ A ［文章编号］ 1672-5042(2006)02-0098-02

Preparation of ^{131}I-labeled anti-IGF1R monoclonal antibody 1H7 and propert identification of the product

LUO Chao-xue, LIU Kai-yuan, CEHNG Shao-jun, LI Qian-wei (Department of Nuclear Medicine, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore how to label 1H7 (monoclonal antibody against type 1 receptor of insulin-like growth factor) with ^{131}I and appraise the quality of the product. **Methods** 1H7 was labeled with ^{131}I by Iodogen method, then purified with Sephadex G-50 column. The radiochemical purity (RCP) of the product was determined by paper chromatography. After stored at room temperature, 4 ℃, -20 ℃ for 8, 16, 24 d respectively, the product was detected for RCP to evaluate its stability. **Results** The labeling rate was 64.6%, the specific activity and RCP of ^{131}I-1H7 was 5.48MBq/μg and 96.42% respectively. Even the product stored at room temperature for 3 half-lives, the RCP was 91.8%. The affinity constant of ^{131}I-1H7 with $HepG_2$ cells was 1.81×10^{11} L/mol. **Conclusion** Labeling 1H7 with ^{131}I by Iodogen method, the product is stable, of a high specific activity, RCP and immune activity.

Keywords: IGF1R; monoclonal antibody; isotope ^{131}I

胰岛素样生长因子（insulin like growth factor，IGFs）是一族既有胰岛素样合成代谢作用又有促生长作用的多肽，有 IGF-1 和 IGF-2 两种。IGFs 主要通过胰岛素样生长因子 1 受体（type 1 receptor of insulin like growth factor，IGF1R），构成自分泌或旁分泌环路而发挥作用。研究表明，IGF1R 在多种肿瘤中有强烈表达，在肿瘤的发生、发展及转移中有重要作用[1-2]。以 IGF1R 的抗体来阻断 IGF1R 的生理作用可能达到抑制或治疗肿瘤的目的。抗 IGF1R 单克隆抗体 1H7 是一种鼠抗人 IgG1κ，主要与 IGF1R 的 α 亚单位作用，抑制 IGF1R 与 IGFs 结合，它与胰岛素受体没有交叉反应。本研究探索以 Iodogen 法用^{131}I 标记 1H7，并对标记结果进行分析。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 $HepG_2$ 为人肝癌细胞系。

1.1.2 主要试剂 鼠抗人胰岛素样生长因子受体单克隆抗体（1H7），Na^{131}I 溶液（无还原剂、无载体，放射性浓度为 109 GBq/ml），Iodogen（1,3,4,6 四氯 3α,6α-二苯基甘脲），Sephadex G-50。

1.1.3 主要仪器 FH463A 自动定标器（探测效率 76%）。

1.2 实验方法

1.2.1 标记前准备 将 Iodogen 溶解于二氯甲烷中制成浓度为 1 μg/μl 的 Iodogen 溶液，取 25 μl 加入乙烯 Eppendorf 管中，氮气吹干后，在试管底部内壁形成一层均匀的 Iodogen 膜。制备完成后保存于 4 ℃备用。

1.2.2 Iodogen 法^{131}I 标记 1H7 参照文献进行[3]。在涂布 Iodogen 的 Eppendorf 管中依次加入 0.5 mol/L，pH 7.6 的磷酸盐缓冲液 50 μl，1H7 20.0 μg（pH 7.6 PBS 溶解，浓度 1 μg/μl），Na^{131}I 170.2 MBq，充分混匀后在室温下反应 8 min，其间温和震荡数次。

1.2.3 分离纯化 反应液滴加于预先经 PBS（0.01 mol/L pH7.4）平衡，2% 牛血清白蛋白封闭饱和的 Sephadex G-50 层析柱上分离纯化标记产物，用 0.01 mol/L pH7.4 的 PBS 洗脱层析柱，自动部分收集器收集洗脱液，流速每管 1.0 ml/min，共收集 60 管；每管取 5.0 μl，FH463A 自动定标器上测量放射性计数，以试管编号为横坐标，对应各管的放射性计数值为纵坐标，制作时间-放射性洗脱曲线。

1.2.4 标记产物^{131}I-1H7 放射化学纯度（radiochemical purity，RCP）及放射性比活度的测定 纸层析法测定标记物 RCP 取

［作者简介］ 罗朝学（1971-），男，四川省南充市人，讲师，硕士，主要从事肿瘤核医学诊断和治疗方面的研究。电话：(023)68765434

［收稿日期］ 2005-12-16 ［修回日期］ 2006-01-10

维普资讯 http://www.cqvip.com

柱层析分离纯化的蛋白峰收集液5.0 μl,在层析滤纸距一端0.5 cm处中央点样(新华3#滤纸,20.0 cm×3.0 cm),点样分多次完成,待上次点样水分蒸发后再在原处作下次点样,点样最终分布范围直径不能超过0.5 cm。在层析缸内用正丁醇:乙酸:水=4:1:5(V/V)的展开剂进行上行层析至原点15.0 cm以上,时间约为4 h。层析完毕后将层析滤纸放于室温下风干,自层析滤纸原点一端开始,横向将滤纸剪成宽0.5 cm的纸条,按顺序装入编号试管,FH463A自动定标器测放射性计数,绘制纸条编号-计数曲线。根据投入的抗体的总化学量,计算出^{131}I-1H7的放射性比活度,蛋白峰收集液以针头滤器过滤除菌后用于下一步实验。

1.2.5 ^{131}I-1H7免疫活性的鉴定 应用^{131}I-1H7与非标记1H7对$HepG_2$细胞的竞争结合实验鉴定标记抗体的免疫活性[4]。

1.2.6 ^{131}I-1H7的体外稳定性 各取3管分别置于室温、4 ℃、-20 ℃,于第8 d、16 d、24 d测定各自放射化学纯度,评价其体外稳定性。

2 结果

标记率Iodogen法碘化标记McAb1H7,经Sephadex G-50柱层析分离游离碘,计算出标记率为64.6 %。标记物的放射性比活度为5.48 MBq/μg。竞争结合分析显示^{131}I-1H7与$HepG_2$细胞结合的亲和常数K值为1.81×10^{11} L/mol,非标记1H7以剂量依赖方式抑制二者结合。^{131}I-1H7的RCP标记产物中蛋白峰以新华滤纸作纸层析,纸层析法测得放射化学纯度为96.42%。蛋白峰收集液共1.0 ml,其放射性浓度为109.52 MBq/ml。^{131}I-1H7的体外稳定性结果见表1。

表1 不同温度保存^{131}I-1H7对放射化学纯度影响

温度	8 d	16 d	24 d
室温	95.3%	94.7%	91.8%
4 ℃	95.8%	95.3%	94.7%
-20 ℃	94.6%	93.2%	91.1%

结果显示,三种温度下放置,即使长达3个半衰期时,放射化学纯度均大于90%,其中4 ℃保存标记物放射化学纯度变化最小。

3 讨论

蛋白质的碘标记方法很多,Iodogen法标记具有碘化效率较高,对标记物的损伤程度小,RCP高等优点[3]。本研究参考任均田[5]的经验采用Iodogen法标记抗IGF1R单克隆抗体1H7,标记率(有的也称碘利用率)达到了64.6 %,较为满意。RCP是指一种放射性核素标记化合物中,特定化学结构的物质的放射性占总放射性的百分数,实际上反映了其中放射性杂质的有无及多少。放射性核素示踪技术无论用于体外实验还是体内研究,都对示踪剂的RCP有一定的要求。如果标记物的RCP过低,就会影响实验的灵敏度、精密度和准确度。本实验所得产物RCP>95%,应当说是很理想的。放射性比活度是标记物的又一项重要的质量指标,是指单位质量放射性物质所具有的放射性活度,表明了其中非放射性物质的多少。如其过高,则辐射自分解严重,可用相应的非标记物稀释;虽然对于某种物质,其放射性标记物与非放射性标记物的化学性质、生物学性质相同或相近,但如果非放射性物质过多,出于放射性测量误差控制中对最小可测量的要求[6],放射性浓度是指单位体积放射性物质所具有的放射性活度,过高时可用相应的溶剂稀释。放射性核素标记化合物的稳定性比相应非标记化合物差,因其存在辐射自分解[8]。将标记物在三种温度下放置长达3个半衰期后,放射化学纯度仍大于90%。总体看来,4 ℃保存可能优于室温及-20 ℃放置,原因可能在于:①1H7在4℃最稳定;②-20 ℃放置时为缓慢冻结,溶质会被挤集在一起,增大了对131I衰变所释放的β射线的吸收效率,而加速了初级外分解。^{131}I标记单克隆抗体属非同位素标记,标记条件控制不当,易使抗体失活、变性。因此,抗体免疫活性保持程度,对用于免疫研究的示踪剂而言,是标记实验成败的关键。我们以人肝癌$HepG_2$细胞上的IGF1R为特异性结合物,采用竞争结合法,测得该标记物的K值为1.81×10^{11} L/mol,超过了体外放射分析对抗体亲和力的要求[3],表明其具有很高的亲和力,免疫活性保持完好。

本研究结果表明,Iodogen法^{131}I标记的抗IGF1R单克隆抗体1H7,有较高的标记率,产物具有高放射化学纯度、放射性比活度、免疫活性及体外稳定性,能满足用于放射免疫研究的要求。

[参考文献]

[1] Werner H. Dysregulation of the type 1 IGF receptor as a paradigm in tumor progression[J]. Mol Cell Endocrinol, 1998, 141(1-2):1-5.

[2] Long L, Rubin R, Brodt P. Enhanced invasion and liver colonization by lung carcinoma cells overexpressing the type 1 insulin-like growth factor receptor[J]. Exp Cell Res, 1998,238(1):116-121.

[3] 夏宗勤. 实验核医学与核药学[M]. 上海:同济大学出版社,1989. 111-113.

[4] 罗朝学,程绍钧,李前伟. $HepG_2$人肝癌细胞胰岛素样生长因子1受体定量分析[J]. 第三军医大学学报,2005,27(3):206-208.

[5] 任均田,李 峰. Iodogen法碘标记McAb技术探讨[J]. 放射免疫学杂志,1996,9(3):145-146.

[6] 程绍钧,余裕民. 检验核医学[M]. 重庆:重庆大学出版社,1999. 37-38.

(编辑:郭光金)