维普资讯 http://www.cqvip.com

重庆医科大学学报 1992年第17卷第2期

(12)128~132 多肽蛋白质激素碘标记方法的研究

第一医院核医学科 罗 加
华西医科大学附属一院 邓尚平 周文碧

R445.5

提 要 本文优选条件并建立了胰岛素，胰多肽及生长激素的Iodogeh标记法。以Iodogen法，lpo法及chT法对胰岛素、胰多肽及生长激素进行碘标记。评价了三种方法的效果，同时观察和比较了三种不同方法的标记物在贮存期间的质量变化差异。结果表明：三种方法均可获得符合放免要求的优质标记物，对于胰岛素或生长激素，Iodogen法可与lpo法或chT法相比拟；对于胰多肽则首选Iodogen法

关键词 碘标记；胰岛素；胰多肽；生长激素
中图分类号 R445.5

^{125}碘标记多肽蛋白质是有关的放射免疫分析（RIA）和放射受体分析（RRA）的必具条件之一。活性好，比放高和使用期长的标记物，对提高分析质量十分有利。常用碘化方法中氯胺T（chT）法和乳过氧化物酶（lpo）法各有优缺点。Iodogen法是近年来应用较多的一种固相碘化法。本文采用上述三种方法标记胰岛素，胰多肽及生长激素，得到了较好的结果。现报道如下。

材料和方法

1. Iodogen标记法 向已涂有Iodogen的聚丙乙稀反应管中，依次加入待标蛋白，3.7mBq（10～20μl）^{125}碘化钠（北京原子能所）及0.5MPB（pH7.4），1min混匀一次，8min后，将反应液移入另一已加有30μlPB的尖底试管中，加40%蔗糖70μl，混匀后立即上柱电泳。

2. lpo法[1] 依次加入0.5MPB（pH7.4），待标蛋白，3.7mBq（10～20μl）^{125}碘化钠，5μl H_2O_2及1.5μl/3.75μllpo，混合2min后，静置3min，加入等体积的40%蔗糖，混匀后上柱电泳。

3. Ch-T法[1] 依次加入待标蛋白，0.5mpB（pH7.4），3.7 MBq（10～20μl）^{125}碘化钠及5μg/5μlCh-T（上海松江余山化工厂），混合45秒钟后，静置30秒。加蔗糖后上柱电泳。

4. 标记物的纯化方法 采用长柱聚丙烯酰胺圆盘电泳分离纯化标记物[2]。电泳电压最高1000伏，起始电流2.5mA/粒，待指示剂带在隔层胶中形成后，增至4mA/粒，电泳时间3小时。电泳结束后，凝胶柱按1.5mm厚度切片，各片分别测放射性，确定放射性峰的位置。用含1%牛血清白蛋白的碳酸氢胺溶液洗脱峰值片的标记物。

5. 标记物的质量鉴定 测定每批标记物的放化纯度（纸层析法）[3]，比放射性（自身置换法）[4]和免疫活性（过量抗体结合率和标准曲线）。

将标记物用含0.5%牛血清白蛋白的0.04MPB等量分装贮存于—20℃。每月测标记物的放化纯度，比放射性及免疫活性，其中胰多肽及生长激素共4个月，胰岛素共9个月。

结 果

1. Iodogen法、Lpo法及ch-T法标记效果的比较： 三种方法所获胰岛素标记物均具有良好的免疫活性。各项参数之间没有明显差别（$p>0.05$）。

维普资讯 http://www.cqvip.com

Iodogen法制备的胰多肽标记物，多项参数优于Lpo法（$p<0.05\sim0.01$），但碘化率和比放二项参数间无显著差异（$p>0.05$）。二种标记物所作抗血清稀释曲线有显著差异。

两种不同标记方法（Iodogen法和ch-T法）所制备的人生长激素标记物各项质量参数均无显著差异（表1）。

2. 不同标记物在贮存期间质量参数的比较：贮存9个月后，Iodogen法和Ipo法胰岛素标记物的免疫活性，比放及放化纯度等均较新标记者降低，标准曲线的斜率仍较好。过量抗体结合率在70%左右，说明标记9个月后的标记物仍可用。chT法标记物在后期的免疫活性则明显下降（表2）。

在4个月的贮存期间，Iodogen法胰多

表 1 不同方法制备的多肽蛋白质激素标记物质量参数的比较

方法		批数	碘化率（%）	放化纯度（%）	标记物回收率(%)	比放（nCi/ng）	过量抗体结合率(%)	NSB（%）	标准曲线斜率
胰岛素	Iodogen法	4	71.8±5.6	98.3±0.96	39.1±5.0	340±23.6	97.1±0.9	3.75±1.2	2.54±0.14
	Ch-T法	4	72.0±4.4	97.6±0.51	34.5±4.7	352±27.6	96±2.8	3.5±0.99	2.61±0.06
	LPO法	4	71.2±1.6	98.3±0.99	39.8±2.3	374±4.9	96.9±0.47	5.1±1.5	2.523±0.23
胰多肽	Iodogen法	3	65.5±7.4	96.9±1.2		253±17	97.6±3.1	4.5±0.7	0.8±0.07
	LPO法	3	63.5±6.1	93.5±0.8		211±16.2	94.7±2.5	6.2±0.9	0.67±0.08
人生长激素	Iodogen法	3	74.1±5.4	95.3±1.6		51±3.2	84.2±2.4	3.7±0.4	1.1±0.1
	Ch-T法	3	70±4.9	94.8±1.1		44±2.9	84.4±2.1	3.8±0.7	0.8±0.2

注：表中数据为$\bar{X}\pm SD$

表 2 三种A-14[^{125}I]碘胰岛素贮存期间质量参数的比较

观察月份	比放（nCi/ng）			放化纯度（%）			过量抗体结合率(%)			Bo/T（%）			NSB（%）			标准曲线斜率		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
1	362	371	332	99	99	98	97	97	98	89	84	76	3.5	40	2.8	2.6	2.4	2.6
2	275	299	255	97	97	96	91	92	87	76	76	73	6.0	5.3	6.5	2.0	2.1	1.8
3	252	251	207	96	96	91	87	89	79	77	76	71	5.2	5.7	6.4	1.8	1.8	1.5
4	187	186	160	96	96	92	87	87	73	76	72	68	4.2	5.5	4.8	1.2	1.4	1.2
5	119	132	104	97	97	90	82	80	69	73	72	57	6.0	8.3	8.7	0.8	1.0	0.7
6	106	122	92	91	94	85	78	80	66	71	73	65	10	11	12	0.7	0.8	0.6
8	101	115	90	88	87	77	76	77	58	71	71	58	8.2	12	15	0.7	0.8	0.6
9	97	87	83	78	78	64	69	67	55	65	65	52	13	14	17	0.7	0.7	0.6
配对t检验	A:B $P>0.05$ A:C $P>0.02$ B:C $P>0.0005$			A:B $P>0.05$ A:C $P<0.0025$ B:C $P<0.0025$			A:B $P>0.05$ A:C $P<0.0025$ B:C $P<0.0005$			A:B $P>0.05$ A:C $P<0.0025$ B:C $P<0.0005$			A:B $P>0.05$ A:C $P<0.025$ B:C $P>0.05$			A:B $P>0.05$ A:C $P<0.05$ B:C $P<0.01$		

注：A. Iodogen 法　　B. LPO 法　　C. Ch-T 法

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 3 ^{125}I-胰多肽及^{125}I人生长激素贮存期间质量参数的比较

*多肽蛋白质激素	观察月份	比放 (nCi/ng)		放化纯度 (%)		过量抗体结合率(%)		Bo/T (%)		NSB (%)		标准曲线斜率	
		A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
^{125}I													
胰多肽	0	268	220	99.8	92.7	99.5	96.7	49.6	40.0	1.3	3.7	0.44	0.38
	1	167	153	95.7	91.6	92.8	86.7	48.7	40.1	16.2	14.3	0.29	0.27
	2	134	93.5	94.1	91.3	90.8	84.1	40.9	37.0	7.5	10.3	0.24	0.17
	4	146	110	93.4	92.5	85.9	75.6	41.7	35.6	6.7	8.9	0.26	0.19
配对t检验		P<0.05		P<0.025		P<0.005		P<0.001		P<0.005		P<0.01	
^{125}I		A	C	A	C	A	C	A	C	A	C	A	C
人生长	0	62.5	53.9	94.2	95.1	82.6	84.1	59.2	55.9	4.5	4.5	1.1	0.8
	1	55.3	46.0	93.1	92.0	73.4	63.4	44.9	41.9	3.2	4.1	0.99	0.71
激素	2	33.0	29.3	90.6	89.6	52.7	53.6	41.1	39.5	2.7	2.9	0.59	0.52
	4	27.6	25.4	87.6	88.3	54.0	54.1	334	33.6	4.1	3.4	0.49	0.45
配对t检验		P<0.025		P>0.05		P>0.05		P>0.05		P<0.05		P<0.05	

注：A，Iodogen法；　B，LPO法；　C，Ch-T法。

肽标记物的各项参数明显优于lpo法者，而两种人生长激素标记物各项参数没有显著差别（p>0.05）（表3）。

3. 贮存期间，A-14[^{127}I]单碘胰岛素的免疫活性，实测比放与理论比放的比较：如图1所示，在贮存后期，标记物的实测比放与理论比放（根据放射性衰变计算者）不平行。免疫活性下降较慢与比放不呈平行关系。理论比放下降较快（曲线斜率=－10.3），实测比放下降曲线的斜率为－8.15。同期测定的免疫活性下降明显较慢（曲线斜率=－2.94）。三条曲线之间有明显差别（p<

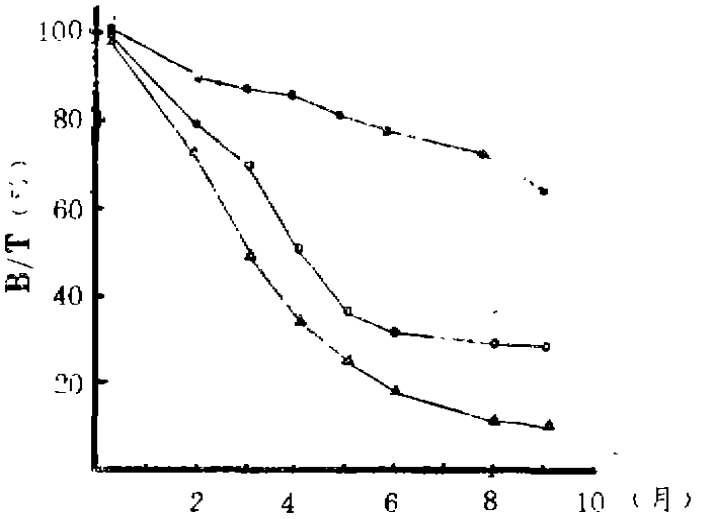


图　贮存期A—14[^{125}I]单碘胰岛素免疫活性，实测比放与理论比放的比较

注：1. ●——●过量抗体结合率
2. ○——○实测比放
△——△理论比放
3. 纵轴以最高比放为100%表示

维普资讯 http://www.cqvip.com

0.00')。

讨　论

放射性碘示踪物的主要质量参数为放化纯度，比放射性和免疫活性。免疫活性的优劣与比放的高低并非完全一致。多碘标记的多肽蛋白质激素比单碘标记物的比放高，但前者的免疫活性可能反而较低，这主要由于被标记物可能发生较多的分子结构改变和较大的辐射自损伤所致。多数作者认为，对标记多肽蛋白质，应力求获得单碘标记物，以尽量保持标记物具有完整的免疫活性[5,6]。本文用不同方法制备的多肽蛋白激素标记物的鉴定结果证实此点。并证明，标记物的免疫活性愈好，贮存稳定性愈佳。实用期也愈长。

获得一种优质蛋白质标记物的制备方法，一般应具有以下特点：1. 标记中很少或无蛋白质分子的化学损伤；2. 能获得单碘原子标记物；3. 标记物的分离纯化完全。

本文采用聚丙烯酰胺圆盘电泳来分离纯化标记物。结果显示，用三种碘化方法均能获得较好的蛋白激素示踪物，其中，Iodogen标记的胰多肽示踪物质量优于lpo法示踪物。

有关对[125碘]标记蛋白质激素质量长期观察的文献报道不多。Linde等曾对胰岛素、胰多肽等标记物作过6个月的连续观察，但对Iodogen法与lpo法或Ch-T法的长期对比研究，尚未见报道。本文对三种多肽蛋白质激素碘标记物作了数月的质量鉴定，其中对胰岛素的观察长达10个月。观察中发现，三种不同碘化方法所制备的A-14-[125碘]-单碘原子碘化胰岛素，在贮存期间其免疫活性及放化纯度等虽呈逐渐下降趋势，但贮存稳定性甚佳。Iodogen法标记物与lpo法标记物的各项参数无明显差异，Ch-T法标记物与前二者相比，在5个月以后免疫活性和放化纯度有较大幅度下降。对[125碘]-生长激素和[125碘]-胰多肽的1个月对比观察结果表明，Iodogen法与Ch-T法125碘-人生长激素的质量变化基本一致；而Iodogen法的125碘-胰多肽质量优于lpo法者。本文结果对于衡量上述三种激素用不同碘化方法的效果具有参考价值。

近年来，国内外学者采用上述三种碘化方法都有获得成功经验的大量报道[7,8]。理论上，lpo法为酶标记法，比较"温和"，对被标记蛋白质的损伤较小，Ch-T法与Iodogen法都是化学氧化法，但Iodogen法为固相法，氧化程度较易控制，故不少学者也称其为"温和"的方法。实践证明，对于每一种蛋白激素，无论用那种方法，反应条件的优选至关重要。包括投料比例，反应体积、反应时间和反应温度的掌握是决定标记能否成功的关键[9]。本文结果显示，125碘标记的胰多肽及人生长激素的期限（货架期）至少为2个半衰期（约4个月），125碘标记的单碘原子胰岛素实用期限长达9个月，比市售的其它胰岛素及人生长激素试剂盒标示者长2—4倍以上。我们认为这并非由于标记方法（氧化试剂）的不同，而是由于标记条件和分离纯化手段的严格控制。

Iodogen法标记多肽蛋白质的效果，文献报道有不同的评价，有认为比lpo法或Ch法好[10]，有认为效果相当[11]也有认为效果不佳[12]。本文结果显示，对于胰岛素和人生长激素，Iodogen法可以与lpo法或Ch-T法相比拟；对于胰多肽，则可优先考虑Iodogen法。总之，Iodogen标记方法的适应性应视不同的蛋白质并作具体实验而加以评价。

对于Iodogen法可能造成的损害较少报道。本文结果表明，反应条件掌握不当，如Iodogen用量过大或反应时间过长，同样可能出现与Ch-T类似的危害。Fox和Paus等的研究也曾有类似报道[13,14]。Bolton等在标记铁蛋白时，Iodogen与铁蛋白

维普资讯 http://www.cqvip.com

的分子比高达23:1[12]，这可能是使铁蛋白标记物免疫活性降低的主要原因。Salascinski等认为Iodogen用量较大所造成的较多氧化态碘离子可作用于蛋白质的蛋氨酸残基，使标记物活性下降[9]。本文实验还注意到，多碘标记物有随Iodogen用量增加而增多的趋势，在温度较高时尤为明显。在同样条件下，此现象在lpo法和Ch-T法则不甚明显。提示Iodogen法较lpo法和Ch-T法更易受温度影响，在应用中应引起重视。

inde等和本研究室均曾报告，A-14[^{125}碘]一单碘胰岛素在贮存期间比放的降低与理论值不一致[14]。实际上，在初期，标记物的比放逐渐下降，但后期相对稳定在较低水平。本文结果证实此点。贮存初期，标记物比放下降较快与^{125}碘的物理衰变大致平行。在后期，标记物分子的损伤加快与^{125}碘的物理衰变大致趋于一致，故使比放稳定在一定水平。

放射性碘标记蛋白质在贮存期中的变化比较复杂，包括放射性衰变，化学的和辐射所致的蛋白质分子损伤，脱碘，形成没有免疫活性的碎片及聚合物等。所谓"合理"的标记物贮存条件，就是采取措施尽量减慢上述诸种变化的发生。这些措施如低温，避免充N_2，加抑酶剂，防腐剂和载体蛋白和适当稀释等。这些无疑对延长^{125}碘标记物的实用期也是十分重要的。

参 考 文 献

[1] 邓尚平，等．胰岛素放射免疫分析 四川医学院资料汇编，1982．

[2] Linde S, et al. Analytical Biochemistry 1980; 107:165.

[3] Salacinski PRP, et al. Analytical Biochemi stry 1981; 117:136.

[4] 邓尚平，等．放射免疫分析基本理论，四川科技出版社，第1版，1986．

[5] Butt WR. Analytical Proceedings 1981; 18:100.

[6] Berson SA, et al. J Clin Invest 1968; 47:2725.

[7] Hunter WN, et al. Nature 1962; 194:495.

[8] Schenck, et al. Clin Chim Acta 1976; 69:225.

[9] Salacinski PRP, et al. J Endocninol 1979; 81:131.

[10] Mary Ann K Markwell and Fred Fox C. Biochemistry 1978; 17:4807—4817

[11] Richter M, et al. Studies on the coagulability of iodine 125I labeled bovine fibrinogen 1984; 112:862.

[12] Bolton AE, et al. Clin Chem 1979; 25:1826.

[13] Paus E, et al In RIA relat Proced Med, Proc Inoc Int SymP Vienna: IAEA, 1982; 161—171.

[14] Linde S, et al. Tyrosine A-14*(125 I)monoiodoinsulin. Diabetcs 1980.

(收稿日期：1991-10-04)

A STUDY ON-THE IODINPTION METHOD FOR PROTEIN AND POLYPEPTIDE HORMONE

Lou Jia, et al

In this study, experiments were performed to establish and optimized iodination conditions of Iodogen method for insulin, PPP and hGH. Insulin, PPP and hGH Were iodinated by Iodogen, LPO and ChT method. By comparing and analyzing some quality parameters, effects of Iodogen, LPO and ChT method had been