DOI:10.16016/j.1000-5404.1995.06.016

内毒素的碘化标记及其影响因素的探讨*

刘友生 晏良逖 陈意生 (第三军医大学基础部病理学教研室)重庆,630038
傅国金 程绍钧 (第三军医大学检验系核医学教研室)重庆,630038

提 要 根据内毒素可以和一种亚胺脂试剂(P-OH Methylbenzimidate,MPHBIM)在碱性条件下发生共价键结合这一原理,对大肠杆菌内毒素(脂多糖,E. Coli O111: B, Lipopolysacchrides,LPS)进行碘化连接标记,经过对一些实验条件的反复摸索和改进,获得了93.6%的标记率和1.6±0.25×10⁵ Bq/μg M-LPS的比活性。经层析、电泳扫描仪等鉴定,表明标记物结合峰的面积在96%以上,生物活性与未标记脂多糖基本相同。体外存放10 d及体内结合试验未见明显脱碘现象,符合体内示踪研究的要求。文中对一些影响标记效果的因素作了较深入的探讨。

关键词 内毒素;亚胺脂;碘化标记
中图法分类号 R361.1

内毒素是存在于革兰氏阴性细菌细胞壁中的重要致病物质,其化学成分为脂多糖(Lipopolysacchrides,LPS)。在烧伤、创伤、感染、休克等情况下,内毒素血症十分常见且有重要致病作用。为研究病理状态下该物质在体内的分布与定位及其变化规律,作者经反复实验摸索,获得了适用于体内示踪研究的碘化标记内毒素,并对其影响因素作了初步探讨。

1 材料与方法

1.1 脂多糖偶联物(M-LPS)的制备

用0.05 mol/L,pH8.0的硼酸盐缓冲液配制50 mmol/L的MPHBIM溶液。用MPHBIM溶液按1 mg LPS/ml配制成脂多糖溶液,置37℃孵育24 h后,用无菌生理盐水在4℃透析24 h,换透析液两次,以除去未结合的MPHBIM,获得的偶联物(M-LPS)经紫外分光光度计测定(200~300 nm),M-LPS和LPS均为$\lambda_{max}=250$ nm,MPHBIM的$\lambda_{max}=255$ nm,根据OD求得偶联物溶液中的LPS的浓度约为1.31 mg/ml。

1.2 M-LPS的碘化标记

在1 ml M-LPS溶液中,加入^{125}I-NaI 74 mBq,磁力搅拌下喷入氯氨-T(ch-T)50 μl(2 mg/ml),室温搅拌30 min后加入NaSO溶液150 μl(2 mg/ml)终止反应,反应液于透析袋内用无菌生理盐水透析3~4 d,每天换透析液3次,直至透析外液中放射性计数率接近本底时止。

2 结果

2.1 碘利用率、标记率和比活性

分别测定透析液、产品和透析袋内残留放射性,同时用新华1#滤纸,将反应液点样层析,展开剂为正丁醇:醋酸:水(4:1:5,V/V),样条用FJ-2109扫描仪扫描,首先确定产品(^{125}I-M-LPS)峰的RF=0.06,并以^{125}I-NaI做对照,其RF=0.36,本底12.4 cpm。数次结果经统计学处理,碘利用率平均55.7%±16.7%,标记率为93.6%±3.7%,比活性为(1.6±0.25)×10⁵ Bq/μg M-LPS。

2.2 放化纯度

将透析后产品用新华1#滤纸和醋酸纤维膜分别进行层析和电泳。层析展开剂同上,电泳液0.05 mol/L硼酸缓冲液(pH10),电压30 V/cm,电泳0.2 mA/cm,电泳1 h。层析和电泳条用FJ-2109扫描仪扫描。在^{125}I-M-LPS的纸层析扫描图中结合峰的面积为92.2%,游离峰的面积为1.78%。经多次层析扫描,结合峰的平均面积为96.34%±2.29%,游离峰的平均面积为3.66%±2.29%。^{125}I-M-LPS的纸电泳放射扫描图中结合峰的面积为96.64%,游离峰为3.36%;醋酸纤维膜电泳扫描也获得同样结果。

2.3 生物活性鉴定

2.3.1 白细胞和腹腔巨噬细胞吞噬情况观察 根据文献[5]方法,将培养结束的细胞用生理盐水洗两次,用多头细胞收集器把细胞收集在49型玻纤滤纸上,以蒸馏水、10%三氯醋酸等处理,取下膜片测其放射性,计算细胞摄取的放射性占投入量的百分数。结果如表1所示。从表中可见^{125}I-M-LPS作为一种异物被细胞所摄取,而^{125}I-NaI为钠盐仅在细胞上粘附一小部分。

表1 白细胞和巨噬细胞摄取标记脂多糖的观察

Tab 1 Observation of leukocytes and macrophage taking in ^{125}I-M-LPS ($\bar{x}\pm s$, %)

	n	^{125}I-M-LPS	^{125}I-NaI	P
Leukocyte	15	18.2±3.6	1.7±0.34	<0.001
Macrophage	15	24.7±2.2	1.5±0.2	<0.001

* 国家自然科学基金资助项目,No.39070377

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

外液之中，从而使透析袋内的前体纯度提高。同时，利用紫外分光光度计对前体进行检测，首先确定二者偶联成功后方行碘化标记，从而避免了标记的盲目性。

放射化学纯度是衡量一种标记化合物产品质量的重要指标之一。鉴于 Ulevitch[4]对标记产品(^{125}I－M－LPS)的放化纯度问题未予提及，本研究采用纸层析、纸电泳和醋酸纤维膜电泳经 FJ－2109 β、γ 色层扫描对该产品的放化纯度进行反复测试，证明了三种不同的鉴定方法所获结果一致，放化纯度均在95%以上，从而提供了证明该方法可靠性的重要参数。

影响 LPS 碘化标记效果的因素诸多，作者先后应用不同的脂多糖产品，不同的偶联物，不同产地 ch－T 和不同的分离方法等作了对比实验和筛选，兹将主要影响因素讨论如下：

3.1 LPS 制品纯度的影响

预试验中，首先采用国产 LPS 制品进行多次标记，结果标记率很低，重复性差，经紫外分光光度计检测，发现其吸光率接近280 nm，提示其中附加蛋白成分过高，而 Sigma LPS 制品系无蛋白、无核酸的脂多糖纯品，能达到本方法的要求。

3.2 不同偶联剂对标记的影响

曾用 BSA 和 LPS 进行偶联(戊二醛法)，经紫外检测，BSA－LPS 的 OD_{max} 为260 nm，居 LPS(OD_{max} = 250 nm)和 BSA(OD_{max} = 280 nm)之间，从波峰看似乎偶联成功，但经葡聚糖 G_{200} 过柱，收集液中出现3～4个峰，提示放射性杂质过多，不及 M－LPS。

3.3 氯氨 T 纯度及用量对碘化标记效果的影响

使用国产化学纯 ch－T 按文献用量，碘利用率在2%左右，标记率在10%左右，加大10倍用量，碘化效果仍不理想，后改用 Sigma 分析纯产品，用量也适当加大，方使产品达到技术要求，其原因可能与此反应体系偏碱(pH8.0)，消耗 ch－T 量较多，且对 ch－T 纯度要求也高有关。

3.4 分离试剂的影响

曾用葡聚糖 G_{75} 和 G_{200} 分离反应液，得到的产品结合峰与盐峰往往不易区分，且峰值后移，可能与 LPS 分子过大，不易过柱有关，因为葡聚糖透析使游离盐极易进入液相之中，后改用盐水透析法方取得满意效果。

参考文献

1 Marek KD, Simoni DVM, Ninnemann JL et al. Endotoxemia after burn injury: effect of early excision on circulating endotoxin levels. J Burn Care Reha Bil, 1989; 10: 101

2 Morrisin DC, Ulevitch RJ. The effect of bacteral endotoxins on host mediation systems. Am J Pathol, 1978; 93: 527

3 Winchurch RA. Involvement of bacterial lipopolysaccharide in trauma-induced immune depression. In: Ninnernann JL, Traumatic injury: Infection and other immunologic sequecae, Baldimore: University Park Press, 1983; 103～117

4 Ulevitch RJ. The preparation and characterization of a redioiodinated bacterial lipopolysaccharide. Immunochemistry, 1978; 15: 157

5 陶义训，主编. 临床免疫学检验(上册). 上海：上海科学技术出版社，1985: 112～126

6 Mathison JC, Ulevitch RJ. Clear, tissue distribution and cellular localization of IV injected LPS in rabbits. J Immunol, 1979; 123: 2133

(收稿：1995-01-03；修回：1995-10-23)

Study of isotope labelling of lipopolysaccharide with an iodinatable linker and factors affecting labeling

Liu Yousheng, Yan Liangsui, Chen Yisheng, Fu Guojin, Cheng Shaojun (Department of Pathology, Third Military Medical University, Chongqing, 630038)

Abstract The lipopolysaccharide (LPS) of E. coli O111: B_4 was isotope-labeled through an indionatable linker according to the principle that LPS can be combined with P-OH-methlbenzimidate in a covalent bond under alkaline condition. It was found that the product (^{125}I-M-LPS) of isotope-labeled LPS through an iodinatable linker showed a high labelling rate (93.6%) and specific acitvity (1.6×10^5 Bq/μg), the area of binding peak was over 96%. Its bioactivity was basically identical with unlabelled LPS as examined by chromatography and electrophoresis. No masked deiodination was found when stored for 10 d in vitro and binding experiment in vivo and could meet the requirement of tracing technique. The factors affecting the success of the labeling process were discussed.

Key words lipopolysaccharide; P-OH-methybenzimidate; iodinatable linker

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net