

抗 CEA 单克隆抗体碘标记方法研究

陆丽仪 韩章淑 戴黛红 林 汉 田 毅

(北京师范大学)

(中国医学科学院放射医学研究所)

本文报道用几种碘标记方法(Iodogen、ChT、NBS、Bolton-Hunter 试剂等)制备了 ^{125}I (^{131}I)-抗CEA单克隆抗体。产品通过 Sephadex G-50(或-75)柱凝胶过滤纯化后,经纸层析和高压液相层析法鉴定,其放化纯度达到使用要求;用免疫放射双抗体夹心法测定,标记抗体能保持良好的免疫活性。同时我们对上述几种碘标方法进行比较研究,结果NBS法标记率最高,达98%,Iodogen法免疫活性保持最好。与CEA的净结合数达9960cpm(3ng CEA/250 μl)。

关键词: Iodogen 法 氯胺 T(ChT)法 N-溴代琥珀酰亚胺(NBS)法 Bolton-Hunter 试剂法
免疫放射分析法(IRMA) 高压液相层析法(HPLC)

放射性碘标记多肽、蛋白质及抗体的方法很多,常用的有氯胺T(ChT)法^[1-3]、乳过氧化物酶促法^[2,4]、 $\text{ICl}^{[5]}$ 法、Bolton-Hunter试剂^[6]和脬化试剂^[7]法等。

碘标记单克隆抗体(McAb)除了应用上述的方法以外,近年来还发展了一种新的方法——Iodogen法^[5,8,9],此法最大特点是能够更好地保持被标记抗体的免疫活性。N-溴代琥珀酰亚胺(NBS)法已用于碘标记蛋白质方面^[10],但标记单克隆抗体不多见。

本研究工作是使用Iodogen、ChT、NBS和Bolton-Hunter试剂等几种碘标记方法制备标记抗CEA单克隆抗体,并对各种方法进行了比较。

一、试剂与材料

1. 抗CEA单克隆抗体,北京生物制品研究所提供。2. Iodogen,美国Sigma公司提供。3. ChT,分析纯,天津化工试剂二厂生产。4. N-Succinimidyl 3-(4-hydroxyphenyl)propionate,简称SHPP,中国科学院生物物理所提供。5. NBS,分析纯,北京化工厂生产。6. Sephadex G-50, G-75,瑞典Pharmacia提供。7. Na^{125}I ,英国Amersham和中国原子能科学研究院提供; Na^{131}I ,中国原子能科学研究院提供。8. 高压液相层析仪:uv-254紫外探测器,组联放射性探测器,中国科学院上海分院科学仪器厂和二六二厂生产。

二、实验方法

1. 碘标记方法

(1) Iodogen 法 50 μg Iodogen溶于50 μl CH_2Cl_2 的溶液放入小玻璃试管底部,室温下使溶剂蒸发干,加入50 μg (20 μl)抗CEA单克隆抗体,18.5—37.0MBq Na^{125}I (Na^{131}I)和100 μl 0.2mol/l pH7.5 PBS,15 $^\circ\text{C}$ 左右反应15—20min,加入3滴0.1mol/l pH7.4 PBS含0.1% BSA。

(2) ChT法 50 μg (20 μl)抗CEA单克隆抗体,40 μl 0.5mol/l pH7.5 PBS和18.5—37.0

MBq Na^{125}I (Na^{131}I), 电磁搅拌下加入 $25\mu\text{l}$ (1mg/ml 同上 PBS) ChT, 15°C 左右反应 2min, 用 $25\mu\text{l}$ (1mg/ml) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 和 $15\mu\text{l}$ KI (20mg/ml) 终止反应。

(3) NBS法 $25\mu\text{g}$ (1mg/ml CH_2Cl_2) NBS 放入玻璃试管底部, 室温下使溶剂蒸发干, 加入 18.5MBq Na^{125}I (Na^{131}I), $50\mu\text{g}$ (7 μl) 抗 CEA 单克隆抗体和 $50\mu\text{l}$ 0.2mol/l pH7.6 PBS, $15-18^\circ\text{C}$ 反应 2min, 用 $15\mu\text{l}$ (1mg/ml) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 和 $15\mu\text{l}$ KI (20mg/ml) 终止反应。

(4) Bolton-Hunter 试剂法 1) ^{125}I (^{131}I)-Bolton-Hunter 试剂的制备: $10\mu\text{l}$ (1 μg) SHPP 的苯溶液, 室温下使溶剂蒸发干, 加入 $37.0-74.0\text{MBq}$ Na^{125}I (Na^{131}I), $10\mu\text{l}$ (5mg/ml 0.2mol/l pH7.5 PBS) ChT 和 $30\mu\text{l}$ 0.2mol/l pH7.5 PBS, 20°C 反应 1min, 用 $10\mu\text{l}$ (5mg/ml) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 和 $20\mu\text{l}$ (20mg/ml) KI 终止反应。即用 0.4ml 苯 (含 0.1% DMF) 提取, 苯提取液即为本试剂。2) 偶联反应: 苯提取液转入玻璃试管中, 室温下用油泵抽干, 得 $23.2-32.6\text{MBq}$ ^{125}I (^{131}I)-Bolton-Hunter 试剂, 在 10°C 水浴中, 加入 $100\mu\text{l}$ 0.2mol/l pH8.7 硼酸钠缓冲液和 $50\mu\text{g}$ (7 μl) 抗 CEA 单克隆抗体, 反应 15-25min, 加 $100\mu\text{l}$ 0.1mol/l 甘氨酸 (用上述硼酸钠缓冲液配制) 终止反应。

2. 标记抗体的分离纯化

上述各方法碘化反应后的溶液加入 2 滴 0.1mol/l pH7.4 PBS 含 0.1% NaN_3 和 0.1% BSA, 立即上 Sephadex G-50 或 G-75 柱 ($0.9\text{cm} \times 50\text{cm}$ 或 $1.2\text{cm} \times 20\text{cm}$), 并用上述缓冲液洗脱, 洗脱液测量, 第一个峰为标记抗体峰, 第二个峰为游离碘峰 (图 1)。

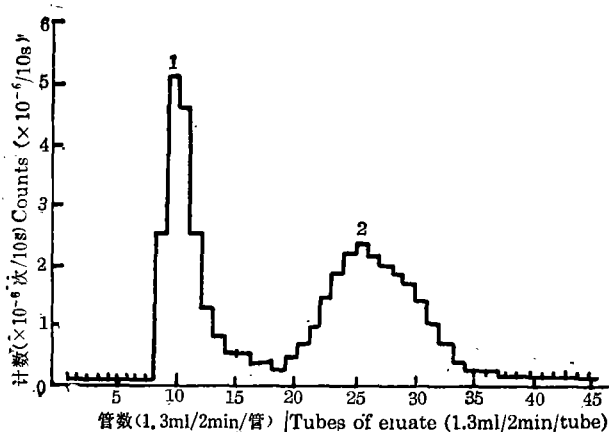


图 1 Sephadex G-50 ($0.9\text{cm} \times 50\text{cm}$) 柱凝胶过滤洗脱曲线
1. 产品峰 2. 无机碘峰

Fig.1 The elution curve of Sephadex G-50 ($0.9\text{cm} \times 50\text{cm}$) gel-filtration column

1. Peak of product 2. Peak of radioiodide

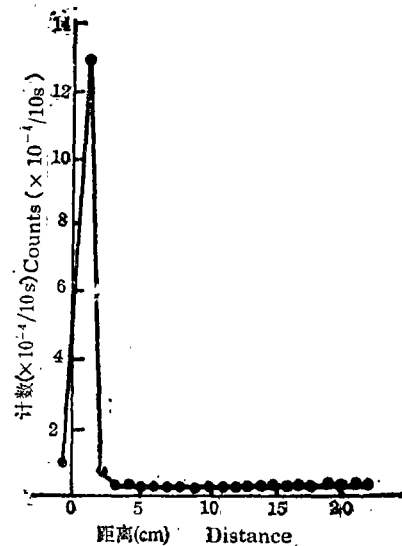


图 2 ^{125}I -抗 CEA 单克隆抗体纯化纯度鉴定 (纸层析法)

Fig.2 Paper chromatography of purified ^{125}I -anti CEA monoclonal antibody

3. 标记率测定

用纸层析法, 将碘化反应后的溶液点样于 whatman 3 号层析滤纸, 展开剂为正丁醇: 无水乙醇: 0.5mol/l $\text{NH}_4\text{OH} = 5:1:2$ (V/V)。所得层析图谱进行放射性扫描, 得到标记抗体峰 R_f ,

$=0.09-0.1$, 无机碘峰 $K_t=0.36-0.5$ 。用 Na^{125}I 和 Na^{131}I 作对照, 与文献值相同。用下式计算标记率 R :

$$R = \text{标记抗体部位的计数} / \Sigma \text{各部位的计数} \times 100\%$$

4. 标记抗体的鉴定

(1) 放化纯度测定 用纸层析法, 用柱凝胶过滤后的纯产品点样, 方法同标记率测定, 得单一放射性峰(图2)。

(2) HPLC 法分析 固定相为无定型微粒硅胶 YWG— $\text{C}_{18}\text{H}_{37}$, 柱长 15cm, 内径 5mm; 流动相为无水甲醇, 流量 0.6ml/min, 纸速 4mm/min。高压 800V, 放大倍数 10, 阈值 3.8V, 道宽 2V。

用柱凝胶过滤后得到的 ^{131}I 纯产品进行分析, 均得单一放射性峰, 并用 Na^{131}I 作对照(图3)。

(3) 标记抗体的免疫活性测定 用免疫放射双抗体夹心法测定, 操作按文献[11]进行, 与 CEA 很好结合, 表明标记抗体能保持良好的免疫活性。

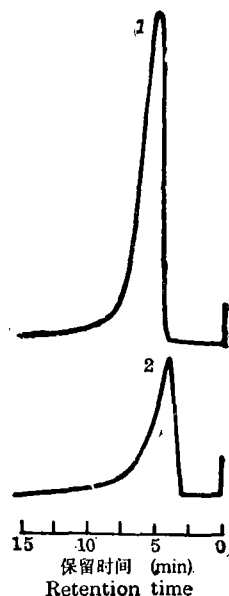


图3 ^{131}I -抗 CEA 单克隆抗体放化纯度鉴定 (HPLC法)

1. 产品峰 2. Na^{131}I 峰

Fig.3 HPLC of purified ^{131}I -anti CEA monoclonal antibody

1. Peak of product
2. Peak of radioiodide

三、结果与讨论

1. 氧化剂的用量与标记率关系曲线见图4。由图4可见, 抗体与 Iodogen 的重量比从 1:1 到 1:4, 标记率变化不大, 但免疫活性是 1:1 时最好。又如 NBS 法从 1:0.5 到 1:6, 标记率在 1:3 时最高, 但免疫活性不好, 于是降低氧化剂用量, 在 1:0.5 时虽然标记率有所降低, 但免疫活性最好。

2. 反应温度对标记率(图5)和免疫活性都有一定的影响, 一般来说反应温度低, 有利于保持免疫活性, 但对提高标记率不利。Iodogen 法在 15—20°C、ChT

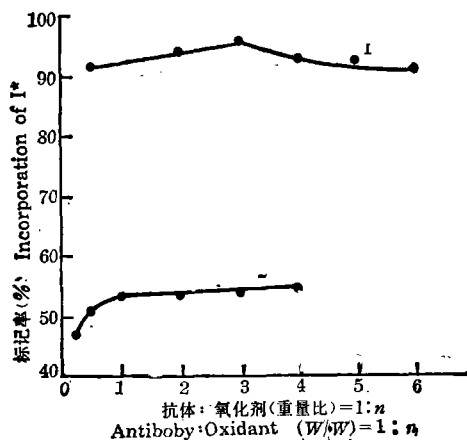


图4 氧化剂用量-标记率关系曲线

1. NBS 法 2. Iodogen 法

Fig.4 Curves for the effect of oxidant amounts on the incorporation of I^*

1. NBS method 2. Iodogen method

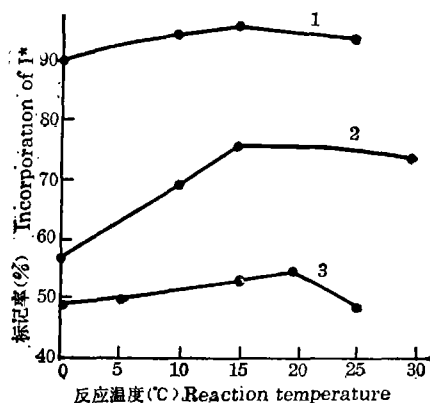


图5 反应温度-标记率关系曲线

1. NBS 法 2. ChT 法 3. Iodogen 法

Fig.5 Curves for the dependence of reaction temperature on the incorporation of I^*

1. NBS method 2. ChT method 3. Iodogen method

法在15℃左右、NBS法在15—18℃、Bolton-Hunter试剂法在0—10℃时,标记率和免疫活性两方面的结果都比较满意。

3. 一般来说,反应时间长,有利于提高标记率(图6),但对保持抗体的免疫活性不利。Iodogen法在15—20min最适宜;ChT法2min为最适反应时间;NBS法与ChT法相类似,Bolton-Hunter试剂法在15—25min都有较好的结果。

4. 碘化时所用缓冲液的pH对标记率有影响,Iodogen法和ChT法所用的PBS均在pH7.5时标记率最高,NBS法在pH7.6时最好(图7),Bolton-Hunter试剂法用pH8.7的硼酸缓冲液进行碘化,亦得到好结果。

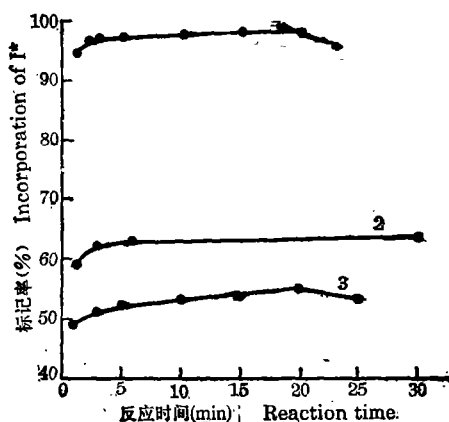


图6. 反应时间-标记率关系曲线

1. NBS法 2. ChT法 3. Iodogen法

Fig. 6 Curves for the dependence of reaction time on incorporation of I*

1. NBS method 2. ChT method 3. Iodogen method

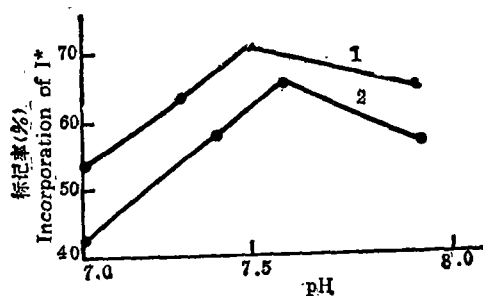


图7. 碘化反应PBS的pH-标记率关系曲线

1. Iodogen法 2. NBS法

Fig. 7 Curves for the effect of pH in iodination reaction using PBS on incorporation of I*

1. Iodogen method 2. NBS method

表1 几种碘标记方法及鉴定结果

Table 1 The several radioiodination methods and detection results

标记方法 Labelled methods	标记率(%) Incorporation of I*		PC 放化纯度(%) Radiochemical purity		HPLC 保留体积(ml) Retention volume	免疫活性测定净结合数 Immunoreactivity assay specific binding cpm(3ng CEA/250μl)	
	¹²⁵ I	¹³¹ I	¹²⁵ I	¹³¹ I	¹³¹ I	¹²⁵ I	¹³¹ I
Iodogen 法 Iodogen Method	71.4	63.9	90.3	89.2	2.9	9477	9960
ChT法 ChT Method	84.2	87.3	94.1	91.3	3.0	5547	9529
NBS 法 NBS Method	90.8	98.1	88.6	95.1	3.0	624	771
Bolton-Hunter 试剂法 Bolton-Hunter Reagent Method	25.7	25.4	89.9	60.4	3.2	2491	2662
					(Na ¹³¹ I)2.7		

各方法用上述选择好的最适反应条件进行碘标记,其结果如表1所示。

从表1看出,不同的碘化方法,免疫活性测定的结果也不相同,净结合数越高的,表明免疫活性保持越好。在上述的几种方法中,Iodogen法和ChT法可选为最好的碘标记方法,用此两法制得的产品已用于IRMA和样品的测定中,结果亦较理想。

参 考 文 献

- [1] F. C. Greenwood and W. M. Hunter, *Biochem. J.*, 89 (1963), 114.
- [2] William C. Eckelman *et al.*, *Cancer Research*, 40 (1980), 3036.
- [3] John M. Ferens *et al.*, *J. Nucl. Med.*, 25 (1984), 367.
- [4] Gary S. David *et al.*, *Biochem.*, 13., (1974), 1014.
- [5] L. C. Knight *et al.*, *J. Label. Comp. Radiophar.*, 18(1981), 50.
- [6] A. E. Bolton and W. M. Hunter, *Biochem. J.*, 133 (1973), 529.
- [7] T. W. Frederck *et al.*, *Anal. Biochem.*, 69 (1975), 339.
- [8] J. F. Pamela *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 80(1978), 849.
- [9] Olli Vuolteenaho *et al.*, *Life Sciences*, 27(1980), 27.
- [10] P. Reay, *Ann. Clin. Biochem.*, 19(1982), 129.
- [11] 林 汉等,中华核医学杂志,6(1986),3:137.

Studies of the radioiodination methods for anti-CEA monoclonal antibody

Lu Liyi Han Zhangshu Dai Daihong

(Beijing Normal University)

Lin Han Tian Yi

(Institute of Radiomedicine Research, Chinese Academy of Medical Sciences)

Abstract

The preparation of ^{125}I (^{131}I)-anti-CEA monoclonal antibody by using several radioiodination methods (Iodogen, ChT, NBS, and Bolton-Hunter reagent etc.) was described. Purification of the product was carried out by the Sephadex G-50 (or 75) gel-filtration column. Its radiochemical purity checked by paper chromatography and HPLC was satisfactory for use. The labelled antibody showed good immunoreactivity, when it was measured by IRMA-bi-antibody sandwich method. The comparative studies for above several radioiodination methods were carried out, among which the iodination efficiency of NBS method was the best (98%) while the immunoreactivity of Iodogen method was the best and specific binding of labelled antibody to CEA was 9960 cpm (3ng CEA/250 μl).

Keywords: Iodogen method ChT method NBS method
Bolton-Hunter reagent method IRMA HPLC

(1987年11月23日收到)