

联结法¹²⁵I标记癌钙蛋白

徐懿群 何荣霞

(江苏省原子医学研究所 无锡 214063)

摘要 介绍了从人体癌组织中提取、纯化肿瘤标志物——癌钙蛋白(简称oncoM), 并采用联结法碘化标记了高比活性的¹²⁵I-oncoM, 其比活度为0.20—0.34TBq/g, 放化纯度达96%。放射免疫测定表明, 当抗血清稀释度为1:4000时, ¹²⁵I-oncoM与特异性抗体结合率达40%, 与非标记抗原能竞争结合抗体, 获得良好的竞争抑制曲线。

关键词 癌钙蛋白, 联结法, 竞争抑制曲线

钙结合蛋白是细胞中的一类重要的蛋白质, 对细胞生理生化过程起着重要的调节作用。癌钙蛋白(oncomodulin简称oncoM)是一种钙结合蛋白, MacManus首先在Morris大鼠肝癌组织中发现它^[1,2], 接着先后在带瘤动物的血液中^[3]、人和大鼠胎盘中^[4]找到它, 并得到了胎盘oncoM纯品。目前已知oncoM在人类的多种肿瘤组织中存在, 其中包括膀胱癌、乳腺癌、子宫颈癌、结肠癌、肝癌、皮肤癌和舌癌等, 阳性率约为85%。经分析证实, 不同来源得到的oncoM是相同的蛋白质。有报道表明, 肿瘤病人血液中oncoM量增高, 但在啮齿类及人类正常组织中均未检测到, 因此, oncoM可作为一种较理想的肿瘤标志物, 经放射性碘标记后可供放射免疫测定。人体内oncoM含量的检测有助于诊断肝、肺等肿瘤的发生, 并有助于oncoM在肿瘤生长中的确切机理研究。本文报道了oncoM的提纯和碘化标记物制备, 这对建立放射免疫分析法是至关重要的。

1 试剂和器材

DEAE-sephacel、sephadex G-50fine, pharmacia产品;十二烷基硫酸钠(SDS)Serra进口分装;聚乙烯吡咯啉酮(PVP)BasF进口分装;低分子量蛋白标准系中国科学院上海生化研究所产品;乙二醇双(α-氨基乙基)醚四乙酸(EGTA)、苯甲基磺酰氟(PMSF)及其它化学试剂均是国产分析纯。Na¹²⁵I系中国原子能科学研究院提供。

肿瘤组织系本市各医院手术切除的癌组织(包括肺、肠、子宫癌等), 经病理切片证实。

2 实验方法

2.1 oncoM分离纯化

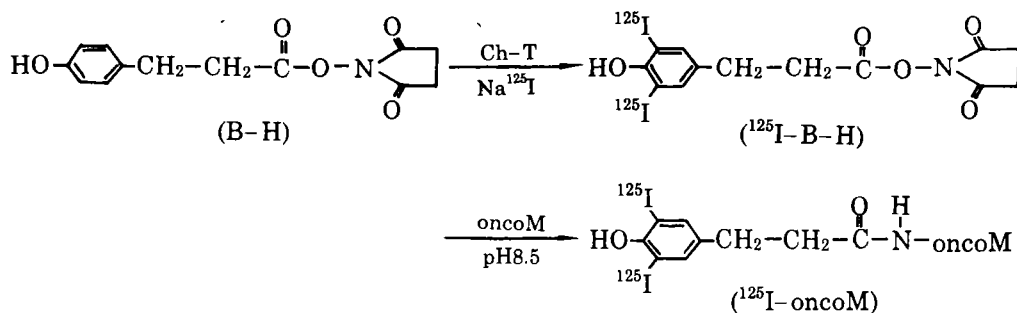
参照MacManus^[2,5]方法加以改进。采用人体癌组织, 加适量缓冲液A制成匀浆, 离心后上清液经80℃加热除去凝固蛋白, 再经硫酸铵65%和100%饱和度分步盐析。将沉淀混悬于缓冲液B中, 经透析得澄清液为粗提物, 再经DEAE-Sephacel柱层析, 先后用缓冲液

收稿日期:1995-06-06, 修回日期:1995-10-30

B、0.1mol/L NaCl洗脱，最后用0.1—0.6mol/L NaCl梯度洗脱，收集浓度在0.3—0.4mol/L NaCl各管，透析，浓缩后经SephadexG-50柱层析，洗脱液于265nm测OD值，收集第二个峰管，透析，冷冻干燥即得oncoM纯品。

2.2 碘化标记物制备

参照并改进了Balton和Hunter^[6]方法，即采用间接标记法，先制备¹²⁵I-Bolton-hunter试剂即¹²⁵I-3(4-羟基苯)丙酸琥珀酰亚胺酯(简称¹²⁵I-B-H)，再通过肽键与oncoM末端氨基相接，得到¹²⁵I-oncoM。联结法标记oncoM反应式为



2.2.1 ¹²⁵I-B-H试剂制备。取预先分装于反应玻璃管内的B-H试剂3 μg，注入约10 μl (3.7 × 10⁷ Bq) Na¹²⁵I溶液，速加氯胺T液10 μl (50 μg)，立即加偏重亚硫酸钠10 μl (120 μg)终止反应，加入碘化钾10 μl (200 μg)。所用氯胺T、偏重亚硫酸钠和碘化钾分别用0.25mol/L和0.05mol/L pH7.5磷酸缓冲液新鲜配制，反应在室温(10—25℃)下进行。

2.2.2 ¹²⁵I-B-H试剂纯化。在上述碘化反应液中加5 μl二甲基甲酰胺，250 μl重蒸苯充分混匀，吸出苯液，重复提取一次，合并苯液，真空干燥器抽干，除去溶剂，得到白色固体¹²⁵I-B-H试剂，分别测定固体物和水层中的放射性活度，求出¹²⁵I-B-H试剂的碘化产率Y

$$Y = [^{125}\text{I-B-H cpm} / (^{125}\text{I-B-H cpm} + \text{水层cpm})] \times 100\%$$

本实验的平均碘化产率为51.12 ± 3.14% (n = 11)。

2.2.3 ¹²⁵I-B-H试剂薄层层析。采用硅胶GF254薄层层析测其放化纯度。展开剂：醋酸乙酯：甲苯 = 1:1 (V/V)，上行展开，分段测其放射性活度。可见第一峰在起点， $R_f = 0$ ，为游离碘，占8.1%；第二峰 $R_f = 0.18$ ，为碘化酯的水解产物；后面仅一个峰， $R_f = 0.72$ ，占总放射性活度的67%，为¹²⁵I-B-H试剂。

2.2.4 ¹²⁵I-oncoM制备。在冰浴(0℃)下，将1g/L oncoM溶液10 μl (0.1mol/L硼酸钠缓冲液、pH8.5配制)注入上述¹²⁵I-B-H试剂管中，充分混匀，加入过量硼酸钠缓冲液，反应一定时间，再加入100 μl甘氨酸溶液(0.1mol/L硼酸钠缓冲液pH8.5配制)，终止反应。于4℃放置10min。将此反应液经SephadexG-50凝胶柱过滤，将¹²⁵I-oncoM与低分子量杂质分开，用含0.25%明胶的0.05mol/L磷酸盐缓冲液pH7.5洗脱，流速12ml/h，0.6ml/管收集50管，每管吸出10 μl于PacKard 5301 γ计数器测量，得淋洗分离曲线。

2.3 oncoM-RIA

反应在0.125mol/L Tris-HCl缓冲液(pH8.4、含0.5% BSA)中进行，抗血清、标准品均用此缓冲液稀释，采用平衡饱和法，于反应管中分别加入缓冲液、不同浓度标准oncoM、定量抗oncoM抗血清及定量¹²⁵I-oncoM(20000cpm)混匀后室温放置1h，4℃反应24h，每管加10% NRS及羊抗兔第二抗体各50 μl，37℃水浴保温30min，离心分离，经Packard 5301

γ 计数器自动测量混合物放射性, 并打印出竞争抑制曲线。

3 实验结果与分析

3.1 提取物鉴定

在提取过程中, 每一步得到的粗提液均经聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)检测, 最后提取物呈现单一蛋白区带, 位置与溴酚蓝指示剂接近, 与文献报道相符^[1]。在 Ca^{2+} 存在和缺乏情况下进行PAGE检测, 电泳结果证明: 在 Ca^{2+} 存在下所提的蛋白质向阳极迁移减少, 等电聚焦测等电点为3.9; 提取物按Swank和Munkers方法^[7]改良进行分子量测定为11900—12000道尔顿, 与文献报道相一致^[8], 证明所提取的钙结合蛋白是较纯的oncoM(图1)。

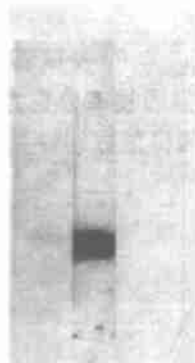
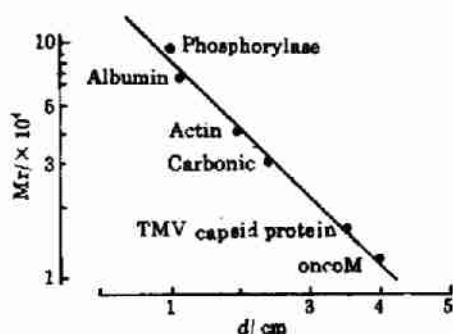


图1 SDS-PAGE分子量测定和oncoM电泳图谱

Fig.1 SDS-PAGE determination of molecular weight and purified oncoM PAGE

3.2 ¹²⁵I-oncoM鉴定

3.2.1 放射化学纯度检测。将¹²⁵I-oncoM点样于硅胶层析纸上, 凉干后在正丁醇:吡啶:水=6:4:3系统中展开, 干后分段测量, 在原点处有一放射性主峰, $R_f=0$, 放化纯度大于95%。标记物经三氯醋酸沉淀试验, 结合率达96%。

3.2.2 放射性活度测定。采用自身取代法测定¹²⁵I-oncoM的放射性活度。首先作一条放免标准曲线, 标准品oncoM含量在2—256ng, 每管加标记抗原(¹²⁵I-oncoM) 20000counts/min, 与此同时另作一条自身取代曲线, 则不加标准品, 以不同稀释度的¹²⁵I-oncoM代替, 放射性活度在 5×10^4 — 8×10^5 counts/min。在两系统中各加一定量抗oncoM抗血清, 混匀后室温放置1h, 4℃反应24h, 每管加第二抗体和正兔血清一定量作分离剂, 37℃水浴保温30min, 离心分离, 测沉淀物的放射性活度, 于半对数坐标纸上作图, 如抗血清对未标记抗原和标记抗原具有相同亲和力,

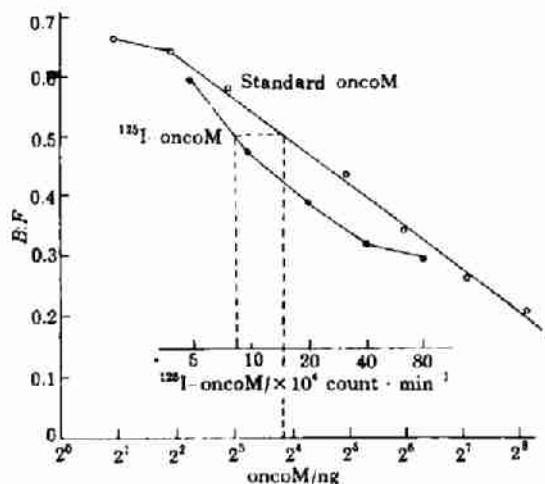


图2 标准曲线和自身取代曲线

Fig.2 The standard and self-displacement curves
则上述两曲线在同一结合率水平, 标记物和标准品的浓度应相同。从图2查得 $B/F=0.5$

(50%结合率)时, 9.2×10^4 counts/min其相应的oncoM含量为14.5ng, 算出 ^{125}I -oncoM放射性比活度范围为0.2—0.34TBq/g。

3.2.3 放射免疫活性检测。将一定量的 ^{125}I -oncoM与不同稀释度的兔抗oncoM抗血清在0.125mol/L Tris-HCl pH8.4反应系统进行结合反应, 用羊抗兔第二抗体为分离剂, 测量沉淀counts/min, 计算结合率, 当抗血清最终工作浓度为1:4000时, B_0 结合率达40%。

3.3 oncoM-RIA标准曲线建立

以 B/B_0 结合率为纵坐标, oncoM剂量对数为横坐标, 绘制竞争抑制曲线(见图3)。

3.4 方法学考核

3.4.1 灵敏度。以10个 B_0 管结合率均值减2s后所对应的剂量为灵敏度, 其测得值为 $4.5 \mu\text{g/L}$ 。

3.4.2 准确度。以回收试验和稀释试验衡量本法的准确度。在缓冲液中加入三种不同浓度的标准品, 测得回收率分别为98.34%、101.17%、97.29%, 平均为98.93%。取同份样品不同稀释梯度与测得量成线性关系(见图4)。

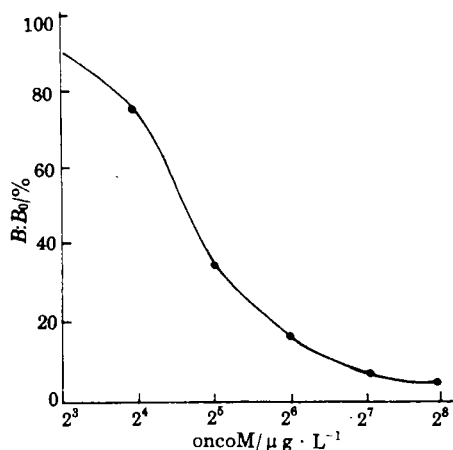


图3 oncoM竞争抑制曲线

Fig.3 The competitive inhibition curve of oncoM

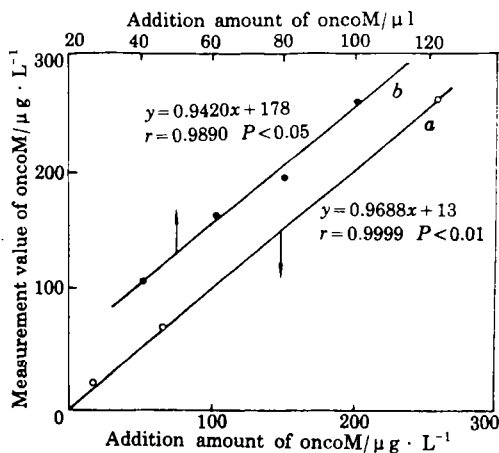


图4 回收试验曲线(a)和稀释试验曲线(b)

Fig.4 Recovery assay(a) and dilution assay(b)

3.4.3 精密度。三份不同浓度的标准品各做10只平行管, 测出批内变异系数分别为1.73%、2.07%、5.05%, 平均为2.95%; 三份不同浓度的样品, 二个月内测定三次, 批间变异系数平均为10.78%。精密度图显示可测范围为8—256 $\mu\text{g/L}$ 。

3.4.4 特异性。将钙调素(Calimodulin简称CaM)配制成一系列不同浓度的稀释液代替标准品与定量抗血清和标记抗原进行反应, 按Abraham法计算得交叉反应率小于0.92%。

标记物放置5周, B_0 结合率和非特异结合均无明显变化, 以上结果证明, 标记物 ^{125}I -oncoM免疫活性是好的。由此建立的oncoM-RIA完全符合放免要求。

4 讨 论

癌钙蛋白是一种热稳定的酸性小分子钙结合蛋白, 等电点为3.9, 于80℃水浴中加热5min仍保持其活性, 每个oncoM分子可结合两个 Ca^{2+} 。在SDS和PAGE电泳中仅出现一条带, 表明是 α -单链多肽。根据其理化特性, 采用上述方法从人体癌组织中分离纯化得到

oncoM, 以蛋白相对含量计算, 最后纯化得率为0.08%, 比文献[2]报道略低, 这是因不同来源的癌组织其oncoM含量不同之故。MacManus首先是从大鼠Morris肝癌组织中分离纯化得到oncoM, 对由不同材料得到的oncoM进行氨基酸组成分析^[4], 研究表明, 来自不同组织的oncoM在氨基酸组成上几乎是完全一致的。这一点也被不同来源的oncoM具有交叉免疫反应这一事实所证明^[9]。为此, 如需获得较多量的oncoM, 可考虑采用大鼠肝癌或其它动物肿瘤组织来提取。

人肿瘤组织中的癌钙蛋白经氨基酸序列分析, 108个氨基酸的组成中无色氨酸, 苯丙氨酸/酪氨酸比率较高, 酪氨酸仅一个。在制备碘化标记物时, 我们曾用氯胺T法和Iodogen法进行标记, 结果制得的标记物均无免疫活性, 故采用联结标记法(Bolton-Hunter法)是最适宜的。该法具有反应自发进行, 条件温和, 避免了高浓度放射性碘、氧化剂及还原剂直接与欲标记的蛋白质接触时对其免疫活性和生物学活性的影响等特点, 实验结果也说明该法是制备oncoM标记物的最佳方法。制得的¹²⁵I-oncoM经放免测定具有较高的免疫活性, 与非标记抗原竞争结合特异抗体, 得到良好的竞争抑制曲线, 由此研制的oncoM-RIA方法稳定、正确、可靠。

参 考 文 献

- 1 MacManus J P. *Cancer Research*, 1979; 39:3000
- 2 MacManus J P. *Biochisuiica Biophysica Acta*, 1980; 621:296
- 3 MacManus J P. *Tumor Biol*, 1984; 5:189
- 4 MacManus J P, Brewer L M, whitfield. *Cancer Letters*, 1985; 27:145
- 5 MacManus J P. *Cancer Research*, 1981; 41:974
- 6 Bolton A E, Hunter W M. *Biochem J*, 1973; 133:529
- 7 Swank R T, Munkres K D. *Analytical Biochemistry*, 1971; 39:462
- 8 Sommer E W, Heizmann C W. *Cancer Research*, 1989; 49:899
- 9 Brewer L M, MacManus J P. *Dev Biol*, 1985; 112:49

Labelling of oncomodulin with ¹²⁵I by the conjugation method

Xu Yiqun He Rongxia

(Jiangsu Institute of Nuclear Medicine, Wuxi 214063)

Abstract

Oncomodulin(oncoM)—a mark of tumor was purified from human tumor tissues, and was labelled with high specific radioactivity by conjugating to an ¹²⁵I-iodinized acylating agent. The specific activity of ¹²⁵I-oncoM was 0.20—0.34MBq/μg and its radiochemical purity was 96%. Radioimmunoassay showed that the ¹²⁵I-oncoM was able to combine with oncoM antibody specifically. The binding rate was 40% at antiserum dilution of 1:4000. Competitive inhibition curve was obtained in the presence of unlabelled oncoM.

Key words Oncomdulin, Conjugation method, Competitive inhibition curve