

脑的年代中大有作为。

参 考 文 献

1 Wagner WH. J Nucl Med. 1990;31:17A	14 Kung HF et al. J Nucl Med, 1989;30:88
2 Wagner WH. J Nucl Med. 1992;33:10N	15 Loch C et al. Eur J Nucl Med, 1989;15:413
3 Wagner WH. J Nucl Med. 1991;32:11N	16 Tatsch K et al. J Nucl Med, 1991;32:1014
4 Leonard BE et al. Neuropharmacology, 1984; 23:213	17 Rutgers AW et al. J Neuro Sci, 1987;880:237
5 Comar D et al. Nature, 1979;280:329	18 Lenders KL et al. Mov Disord, 1986;1:69
6 Comar D et al. Psychiatry Res, 1979;1:23	19 Friedman AM et al. Eur J Pharmacol, 1985; 108:327
7 Maziere B. Eur J Nucl Med, 1990;16:817	20 Dodds HN et al. J Pharmacol Exp Ther, 1987; 262:257
8 Friedman AM et al. Int J Nucl Med Biol, 1982;9:57	21 Holman BL et al. JAMA, 1985;254:3063
9 Wagner WH. et al. Science, 1983;221:1264	22 Maziere C. Costa E GAMA and Benzodiazepin Receptors. New York;Raven Press,1981:273
10 Laduron PM et al. Biochem Pharmacol, 1984; 33:833	23 Schubiger PA et al. Nucl Med Commu, 1991; 12:569
11 Stoof JC. Life Sci, 1984;35:2281	24 Leysen JE et al. Neuropharmacology, 1984; 23:1493
12 Wang DF et al. Science, 1986;234:1558	25 Jones AKP et al. J Neurosci Methods, 1988; 23:121
13 Mertens J et al. J Nucl Med, 1989;30:926	26 Nybak H et al. Prog Brain Res, 1989;79:313

## LPO 碘化蛋白质和多肽方法及其应用

中国医学科学院放射医学研究所 牛惠生 李怀芬综述  
中国医学科学院协和医院 王世真审校

摘 要:LPO 酶促放射性碘标记物的比放射性高、定位性好、能最大限度的保持标记物的生物学和免疫学活性,是一种理想的蛋白质和多肽的标记技术。本文就 LPO 法对蛋白质和多肽放射性碘化标记原理、LPO 制备和性质、碘化反应和特点以及方法的应用进行了综述。

放射性碘标记物已成为现代分子生物学、分子药理学、免疫学、临床检验学和临床治疗学研究和应用的重要试剂。尽管有放射性本身的不利因素,但是放射性碘(<sup>125</sup>I 和 <sup>131</sup>I)具有半衰期适中、用量少和放射性测量方便的特点,乃有取代<sup>14</sup>C 和 <sup>3</sup>H 核素之趋势。

乳过氧化物酶(LPO)促放射性碘标记物的比放射性高、定位性好、能最大限度地保持标记物的生物学和免疫学活性,并可以进行活细胞(细胞膜、膜受体和细胞器等)标记,因此比其他碘化标记方法具有更多的优越性,是一种理想的蛋白质和多肽的标记技术。

### 1 LPO 的制备<sup>[1-4]</sup>

LPO 除少量存在于唾液腺和泪腺外,主要存在于奶汁中。因为 LPO 能被阳离子树脂所吸附,所以 LPO 的制备一般是在新鲜牛奶中直接加入一定的 Dowex-50 或 CM-Cellulose 在 10℃~15℃ 搅拌下吸附 1~2 小时,然后低温离心,收集绿褐色吸附剂。再用 2~3 倍体积蒸馏水洗三次,将吸附剂装柱后梯度洗脱、收集蛋白质峰液,以 60% 饱和度硫酸氨分级,离心收集绿褐色上清液,透析除去硫酸氨后冷冻浓缩。进一步的提纯用 Sephadex C-

50分离,收集具有LPO活性的蛋白质流出液,合并后冷冻干燥,低温保存。测定LPO活力和蛋白质的含量,计算出酶的活力。

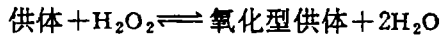
## 2 LPO的性质和活力测定

### 2.1 LPO的结构和性质<sup>[6-7]</sup>

LPO属于过氧化物酶类(E.C.1.11.7),分子量为77 500±3 000道尔顿,它有两个亚基,每个亚基各有一个辅基,N-末端的亮氨酸通过酯键与C-末端形成环状结构。LPO辅基可与血红蛋白配体相互作用,配体可被H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>所激活。LPO的微分比容为0.93~0.96,280nm(A<sub>1%</sub><sup>1cm</sup>)特异光密度为1.541。

### 2.2 LPO活力测定

LPO酶促反应式为:



其最适pH为7。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>是专一的氢受体,氢供体一般是苯酚或氨基苯酚二胺等,最常用的是对羟基二苯。活力测定方法有三种。

#### 2.2.1 分光光度法

Maehly以邻-联(二)茴香胺作氢供体(DH<sub>2</sub>),反应后生成氧化型产物,在460nm测定光吸收(OD)值。Guilbault采用4-甲氧基-1-萘酚为氢供体,反应后生成深蓝色氧化型产物,在620nm处的消光值为1.8×10<sup>4</sup>,可测定范围为0.01~0.17单位/ml。

#### 2.2.2 电化学法

将两个铂金板浸入底物H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>和连苯三酚溶液,加入LPO后电压升高,升高的幅度与LPO浓度成正比,可测定范围为0.01~1.00活力单位/ml。

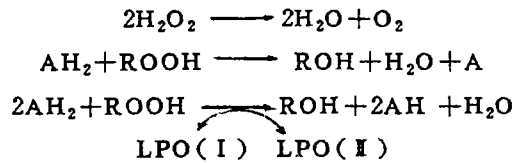
#### 2.2.3 荧光法

选用没有荧光的高茴香草酸(HVA)为氢供体,氧化成为有强烈荧光的二聚物,激发波长为315nm,发射波长为425nm,在LPO浓度为0.01~2.00单位/ml范围内生成的荧光产物浓度与LPO活力成正比。

## 3 LPO碘化标记蛋白质和多肽的原理

### 3.1 LPO的环状结构和碘化原理<sup>[8-10]</sup>

LPO环状结构中含有变价铁离子(Fe<sup>+</sup>)以及一个被H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>激活的亚基和一个催化亚氧化物(-O-O-)的亚基,其碘化反应原理如下:



其中,AH<sub>2</sub>为氢供体(NaI),ROOH为过氧化氢。在反应系统中,通过LPO构型的变化而使Na<sup>125</sup>I或Na<sup>131</sup>I生成<sup>125</sup>I<sub>2</sub>或<sup>131</sup>I<sub>2</sub>,取代酪氨酸苯环羟基α位的氢。

### 3.2 蛋白质或多肽碘化标记的位置<sup>[11]</sup>

蛋白质和多肽是由不同种类、不同数量的氨基酸通过肽键连接而成,碘化标记只能发生在氢供体杂环氨基酸的结构上,见图1。

采用LPO法碘化标记只能产生(1)、(3)和(4),并且主要标记在蛋白质和多肽结构中暴露的酪氨酸残基上。然而,当酪氨酸残基呈现图2的形式时,碘化标记将不能实现。

我们对来自人、牛、兔、大鼠和小鼠66类143种蛋白质的氨基酸组成进行分析发现都含有酪氨酸,而且数量较多,如人补体CIQ(130~131个)、牛第5因子(67~68个)、人血纤维稳定因子(67~68个)、大鼠α<sub>1</sub>-巨球蛋白(163~164个)和人免疫球蛋白(233个)等,因此可以说,几乎一切蛋白质和多肽都可以利用LPO法制备碘标记物。

## 4 LPO放射性碘标记的方法<sup>[12-14]</sup>

LPO酶促碘化反应液含:25μl pH为7.0~7.5的0.2mol/L磷酸缓冲液、25μl(约2.0~5.0μg)待标记物、50μl(约1.0~1.5mCi)Na<sup>125</sup>I(或Na<sup>131</sup>I)和10μl(约0.5μg)LPO,反应是从第一次加入微量的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>开始,以后每隔5分钟加入一次H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,反应到20~30分钟,加入20μl(约200ng)巯基乙醇终止反应。根据待标记物的分子量选择适宜的Sephadex,使反

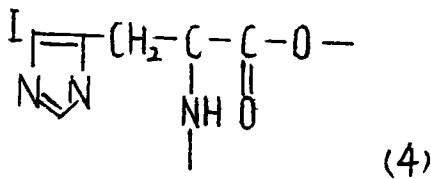
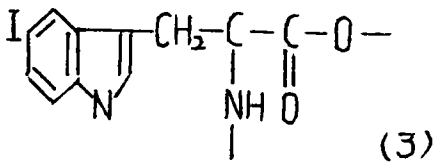
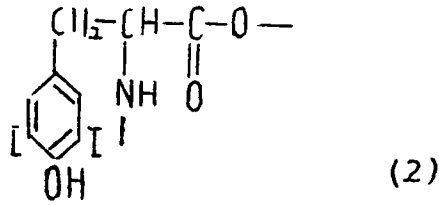
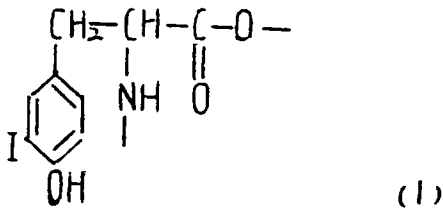


图1 蛋白质结构中氨基酸残基被碘化的位置

(1)、(2):酪氨酸; (3):色氨酸; (4):组氨酸

应混合物经过 Zerolit 和 Sephadex 双层柱分离,用0.05mol/L pH 为7.4的磷酸缓冲液洗脱,收集流出液(约8滴/管),流速为5滴/分钟。流出液的放射性接近本底时停止收集。逐次测定收集管的放射性强度(CPM),并同时测定蛋白质含量。将碘化标记蛋白液合并,低温保存。

### 5 LPO 放射性碘化标记的特点<sup>[15~22]</sup>

在制备放射性碘标记蛋白质或多肽时,常用氯胺 T(ch-T)法、氯甘脲(Iodogen)法、过碘酸法、电解法和 LPO 法,李怀芬等对上

述方法对比研究后认为,LPO 法优于其他方法。LPO 法具有如下的特点:

#### 5.1 能最大限度地保持待标记物的生物学和免疫学活性

LPO 碘化标记过程是生物学的酶促反应,温和而可控性强,微量氧化剂(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)底物采取分次加入,有效地防止待标记物分子结构的破坏。

#### 5.2 标记物具有较高的稳定性

由于碘仅标记在蛋白质或多肽结构中暴露的酪氨酸残基上,而且是单标记,故放射性碘不脱落,并大大地减弱了标记物的辐射自分解。

#### 5.3 有效地利用待标记物和放射性碘原料

高纯度待标记物(蛋白质或多肽)的获得十分困难,放射性碘原料(Na<sup>131</sup>I 和 Na<sup>125</sup>I)由反应堆生产,也十分珍贵。由于 LPO 法反应温和,可控性强和反应较彻底,从而对待标记物和原料的利用率可达80%以上。由于 LPO 在标记反应中的化学量不足待标记物的1/10,其自身碘化不足0.2%,所以不会造成标记物的污染。

### 6 LPO 碘化标记方法的改进和应用<sup>[23-30]</sup>

LPO 碘化标记技术主要应用于蛋白质和多肽放射性碘标记物的制备,在其他氢供体类化合物的碘化物制备中也常使用。为了避免反应物中微量 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>对待标记物的氧化,有的学者将 LPO 与葡萄糖氧化酶(GO)联用,GO 以葡萄糖为底物使其氧化而连续地产生微量的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,并不断地被 LPO 所利用。这一改进称为 LPO-GO 碘化标记。为了防止碘化标记过程中 LPO 和 LPO 自身碘化产物对待标记物的污染,有的学者将 LPO 连接在葡聚糖珠的外表面上,使其 LPO 既具有 LPO 的功能,而又不溶解于反应液中,当碘化反应完成后,只需将反应液中剩余的无机碘分离出去即可得到高纯度的碘化产物。这种改进称为固相 LPO 酶促碘化标记。随着科学技术

的发展,LPO 碘化标记技术也将日臻完美。

由于加速器生产核素技术的发展,使放射性碘核素在已有的<sup>126</sup>I 和<sup>131</sup>I 基础上,又增加了<sup>123</sup>I,其半衰期为13小时。人们可以根据实际需要选择半衰期和射线能量适宜的碘核素,极大地开拓了放射性碘核素在生物医学研究和实践中的应用。

LPO 碘化标记方法是制备放射性碘标记物的一项技术,它的应用取决于放射性碘标记物的应用,概括起来有以下几个方面:

6.1 在RIA 和IRMA 中的应用

生物体内微量活性物质含量的测定,由于放射免疫分析(RIA)技术的出现,成为向分子生物学进军中的一个重大的技术突破,它是现代核技术与免疫学结合的典范。这一技术的核心试剂是具有免疫活性的放射性核素标记物(抗原和半抗原),而蛋白质和多肽都具有抗原的属性,因此蛋白质和多肽的放射性碘标记物成为RIA 的重要试剂。单克隆抗体技术的发展极大地推动了免疫放射分析(IRMA)的应用,这是因为这种方法用标记抗体与被测抗原结合,测定复合物的放射性,从而推算出抗原的含量,灵敏度比RIA 高出许多。我们知道,抗体都是蛋白质,因此,放射性碘标记的抗体自然成为这一技术的关键试剂。随着新抗原的发现和抗体的问世,抗原和抗体放射性碘标记物的种类和数量将与日俱增。

6.2 受体放射分析和细胞学研究的应用

受体放射分析已从基础研究阶段向实际应用发展。受体是功能细胞外部信息的接受器,特异激素和药物通过与细胞受体结合而产生细胞的功能,因此研究细胞受体的种类、数量和功能成为细胞分子生物学的重要领域。受体放射分析的关键试剂是放射性核素标记的受体接受物,这些接受物有一部分是蛋白质或多肽,还有一部分是氢供体类化合物,它们都可以采用LPO 方法制备出相应的放射性碘标记物。至于细胞器和细胞膜功能

的研究也广泛地使用放射性碘标记物,特别是蛋白质和多肽,因为它们的功能常常是通过特异的蛋白质和多肽来实现的。

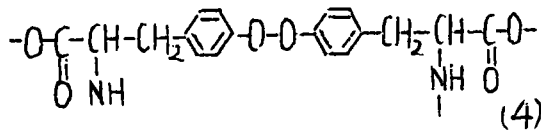
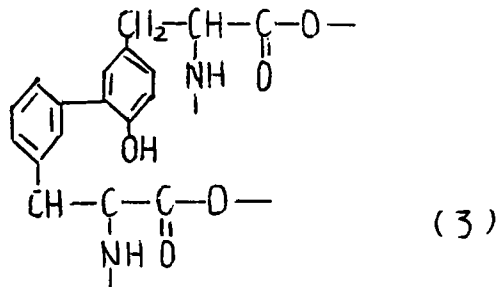
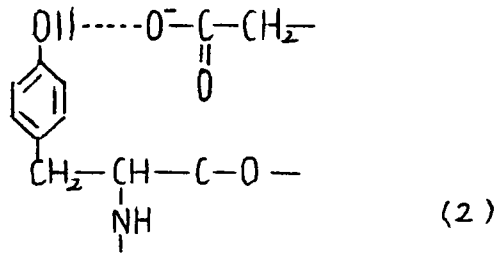
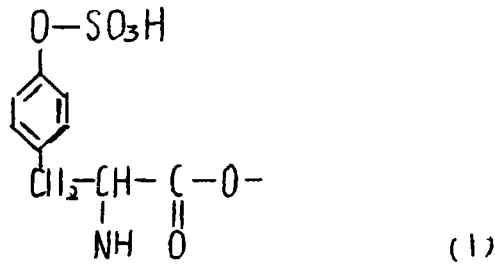


图2. 蛋白质结构中不能发生碘化反应的酪氨酸残基形式

6.3 在临床上的应用

放射性碘标记物在临床上的应用已有近半个世纪的历史,特别是放射性核素显像技术(如SPECT)的问世,它通过特异的核素(包括放射性碘)标记的生物活性物质,可以动态地观察心脏泵功能,心肌血流灌注、血流通路、心肌代谢和心室壁的运动情况,对脑血

流和缺血区的定位检查、消化道和实质性器官的功能及占位性病变的判断、骨代谢和骨病的诊断等收到满意的效果。这些检查都以放射性标记物为前提,其中放射性碘标记物是重要的一部分。随着肿瘤基础研究的深入,特别是肿瘤标志物的不断发现,为肿瘤的早期发现开创了喜人的前景,为人类征服肿瘤带来曙光,粗略地统计目前确认的肿瘤标志物,大多数是肿瘤细胞的特有蛋白质或多肽,制备出这些蛋白质和多肽的特异抗体,再制备出这些抗体的放射性碘标记物,便可以通过体内的和体外的放射性核素检测来确认肿瘤的存在、部位和大小。因此,放射性碘标记物在临床上的应用是十分广泛的。

至于用放射性碘标记核酸(DNA和RNA)与核苷酸在基因和基因序列方面的研究、标记植物活性物质对植物生理生化的研究、标记植物果实累积物前体研究植物营养的储运和转化等,只要是氢供体类的物质,均可采用LPO方法制备出高质量的放射性碘标记物。

#### 参 考 文 献

- 1 Chisolm III et al. *Anal Biochem*, 1981;111:212
- 2 Thorell JI et al. *Biochem Biophys Acta*, 1983;25:541
- 3 Rombauts W et al. *Biochemistry*, 1967;6:2965
- 4 Tusztanski GP et al. *Anal Biochem*, 1980;106:118
- 5 Metodiewa T et al. *Biochem Int*, 1991;25(5):895-904
- 6 Rivera-Sagredo. Alfonada, *Eur J Biochem*, 1992;209(1):415-22
- 7 缪辉南等译,酶法分析手册,上海科学技术出版社, 1983;138-141
- 8 Charlwood PA et al. *Biochem Biophys Acta*, 1979;585:61
- 9 Schonbaum G R and Chance B. *Catalase*, in *The Enzymes*, Vol.13,363,1976,New York.
- 10 Walsh C. *Enzymatic Reaction Mechanisms*, W H Freeman, San Francisco, 1979, 488
- 11 Inone M et al. *Biochemistry*, 1981;20:2936
- 12 Wahl RL et al. *J Nucl Med*, 1983;24:316
- 13 Keenam AM et al. *J Nucl Med*, 1985;36:531
- 14 Sato K. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1992;56(2):2054-5
- 15 Larson SM et al. *Cancer Invest*, 1984;2:363
- 16 Shoerfeld Y et al. *N Engl J Med*, 1984;311:1019
- 17 Sullivan KH et al. *Anal Biochem*, 1982;120:254
- 18 Knight LC et al. *J Labelled Comp Radiopharmacol*, 1981;18:50
- 19 Doran DM et al. *J Immunol Methods*, 1980;39:155
- 20 Langone JJ. *J Immunol Methods*, 1982;51:3
- 21 邓尚平等. *核技术*, 1984;6:52-54
- 22 李怀芬等. *中华核医学杂志*, 1981;1(1):41-45
- 23 李怀芬等. *同位素*, 1992;5(3):148
- 24 李怀芬等. *放射免疫杂志*, 1991;6(2):72
- 25 Reboul G. *Eur Pat Appl*, EP 513896, Nov19 1992
- 26 赵武述. *核医学与核生物学*, 王世真等主编. 科学出版社, 1990, 356-358
- 27 林祥通等. *国外医学·放射医学核医学分册*, 1987, 2, 95-99
- 28 李怀芬等. *中华核医学杂志*, 1991, 11(增刊):82
- 29 李怀芬等. *中华核医学杂志*, 1991, 11(2):122
- 30 李振甲等. *实用放射免疫学*, 科学技术文献出版社, 1989, 41-57