

非放射性碘标记-电感耦合等离子体质谱用于免疫分析研究

李景喜¹, 王小如^{1,2*}, 庄峙厦², 崔维刚¹

1. 国家海洋局第一海洋研究所生态研究中心, 山东 青岛 266061

2. 厦门大学化学化工学院化学系, 现代分析科学教育部重点实验室, 福建 厦门 361005

摘要 研究了非放射性碘标记-电感耦合等离子体质谱免疫分析体系, 该体系以兔抗大肠杆菌作为模型抗原, 羊抗兔 IgG 蛋白为抗体, 建立了一种新的免疫分析方法。实验中采用溴代琥珀酰胺 (NBS) 为氧化剂, 实现非放射性¹²⁷I 标记羊抗兔 IgG 蛋白, 探索了标记的最佳条件, 标记率为 63.12%; 标记物在 Sephadex G50 柱上分离纯化后, 研究了羊抗兔蛋白的稳定性, 结果表明, 标记物在 4℃ 放置 96 h 后几乎没有碘脱落, 并保持一定的活性。实验中采用聚苯乙烯 96 孔板作为固相载体进行免疫反应, 以电感耦合等离子体质谱为检测手段, 方法的检出限为 0.12 mg·L⁻¹, RSD (n=9) 为 3%; 该体系也可适用于其他活性蛋白、核酸等的标记和分析。

关键词 非放射性碘; 免疫分析; 电感耦合等离子体质谱

中图分类号: O657.3 文献标识码: A DOI: 10.3964/j.issn.1000-0593(2010)03-0788-04

引言

放射性碘标记化合物广泛应用于放射性核素显像、放射性核素治疗、放射性示踪分析、放射免疫分析和放射受体分析等, 所以放射性碘标记技术已在现代分子生物学、分子药理学、临床检验学和治疗学中广泛应用。长期以来, 碘标记化合物制备方法的研究一直受到重视; 研究放射性碘标记率高, 被标记物损伤小、保持其较好生物活性和免疫性, 放射化学操作方便的碘标记方法是追求的目标。随着标记蛋白质在生物医学中的广泛应用, 对碘标记方法提出了更高的要求。但目前运用的标记方法总有很多的缺陷, 甚至有时已不能满足实际需要, 限制了碘标记化合物应用的发展^[1]。放射性碘标记蛋白质的常用方法有 Iodogen 法、氯胺 T (Chl-T) 法和乳过氧化物酶法 (LPO) 等, 1978 年 Fraker 和 Speck 首次报道应用 Iodogen 标记蛋白质成功以来, 国外发展较快^[2], Iodogen 是一种不溶于水的温和氧化剂, 由于它固定于管壁上, 离开反应体系即终止碘化过程, 不需要加入还原剂, 故蛋白质碘化反应过程的损伤较小, 但该反应过程缓慢, 标记率较低。氯胺 T 法由于体系中有过量氧化剂, 乳过氧化物酶法需要加乳 H₂O₂ 和酶, 均能造成蛋白质分子结构的损伤或某些蛋白质的降解。另外, 放射性碘同位素, 其放射性作用

容易引起脱氧核糖核酸、蛋白及酶类等分子变化和结构的破坏, 容易破坏蛋白等活性。放射性核素碘标记的抗人肝癌单克隆抗体在肝肿瘤组织内的定位已有许多报道^[3], Panyutin 等^[4]以 DNA 聚合酶合成寡核苷酸时, 将¹²⁵I 参入其中, 但产量很低。Dewanjee 等^[5,6]用 PMPITC 作连接剂标记¹²⁵I 和¹³¹I, 但标记率仅约为 40%, 而且标记稳定性不够理想。

本研究采用了 Mather^[7]报道的溴代琥珀酰胺 (NBS) 法, 将该方法用于非放射性¹²⁷I 标记羊抗兔蛋白中, 并用 Sephadex G50 将碘标记蛋白与游离碘-127 分离。由于¹²⁷I 是唯一稳定碘同位素, 且其来源方便、价格低廉、标记容易、废液易处理等优点, 因而可被广泛使用。实验证明, NBS 法标记反应步骤简便, 反应只需 2 min, 且标记率高、抗体活性好, 是一种较理想的碘标记方法。

关于碘测定的方法已有综述报道^[8-12], 应用较普遍的方法多为催化分光光度法、荧光分光光度法^[13]、电化学分析方法、原子吸收光谱等, 但这些化学法操作繁琐, 分析速度慢, 耗时且不易掌握。电感耦合等离子体质谱 (ICP-MS) 具有灵敏度高、检出限低、选择性好、可测元素覆盖面广、线性范围宽、能进行多元素同时分析和同位素比测定等优点。目前一些采用 ICP-MS 测定碘的报道大多是关于生物样品如奶粉、血液以及尿液等的分析^[14-19], 但 ICP-MS 与作为免疫分析检测报道很少, 本研究中当碘-羊抗兔 IgG 蛋白与包被板

收稿日期: 2009-02-22, 修订日期: 2009-05-25

基金项目: 海洋公益性行业科研专项项目 (200705011), 中国海监技术支撑体系项目和 2008 年海洋环境保护及节能减排专项项目资助

作者简介: 李景喜, 1980 年生, 国家海洋局第一海洋研究所生态研究中心研究实习员 e-mail: jxli@fio.org.cn

* 通讯联系人 e-mail: me2elp@fio.org.cn

上的兔抗大肠杆菌反应完全后,采用稀氨水溶液将碘洗脱并经 ICP-MS 检测;其中,抗体与抗原发生免疫反应后,解脱标记在抗体上的碘是重要的环节之一,而稀氨水是较好的弱碱溶液,因为以 ICP-MS 作为检测手段时,采用稀 $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 溶液也可以大大减低了 ICP-MS 测定碘过程的记忆效应。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

电感耦合等离子质谱仪 ICP-MS 7500a(美国 Agilent 公司);生物培养箱(常州国化仪器厂);HL-2 恒流泵;振荡器;Beckman DU-7400 紫外-可见分光光度计;移液器等。

羊抗兔 IgG 蛋白(华美生物工程集团);牛血清白蛋白(北京元亨圣马生物技术研究所);酪氨酸(上海长江生化制药厂);兔抗大肠杆菌(集美大学水产学院生物实验室);10%氨水,10 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ K^{127}I 溶液;N-溴代琥珀酰亚胺(NBS)(Alfa Aesar)等试剂均为分析纯试剂;葡聚糖凝胶 Sephadex G50;超纯水(18 M $\Omega \cdot \text{cm}$)。

包被液 100 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ NaHCO_3 缓冲液(pH 9.50);淋洗液 50 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ PBS(pH 7.50)含有 9 g $\cdot \text{L}^{-1}$ NaCl;封闭液 50 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ PBS(pH 7.50)含有 9 g $\cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 和 5% BSA;洗涤液 50 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ PBS(pH 7.50)含有 9 g $\cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 和 2% Tween 20。

1.2 仪器工作条件

射频功率 1 200 W;采样深度 6.5 mm;等离子体气流量 16.0 L $\cdot \text{min}^{-1}$,辅助气流量 1.00 L $\cdot \text{min}^{-1}$;采样锥孔径 1.0 mm;截取锥孔径 0.8 mm;样品提升速率 1.0 mL $\cdot \text{min}^{-1}$;分析模式 定量分析;单位质量数采集点数 3;数据采集模式 jump;驻留时间 30 ms;数据采集重复次数 3;积分时间 0.100 s。

1.3 实验方法

以聚苯乙烯(PS)微孔板为固相载体,首先将一定量的兔抗大肠杆菌吸附在 PS 板上,然后用牛血清溶液进行非特异性封闭;将标记好的 ^{127}I 羊抗兔 IgG 蛋白在 37 $^\circ\text{C}$ 条件下与兔抗大肠杆菌反应 1 h 后,用 10%的稀氨水溶液解脱标记在蛋白上的碘,洗脱液经 ICP-MS 检测,简要流程图如图 1。

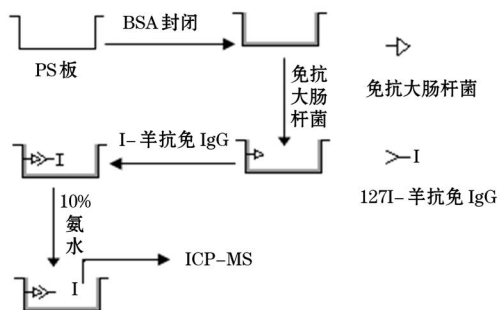


Fig 1 Flow chart of immunoassay by ICP-MS

2 结果与讨论

2.1 羊抗兔 IgG 标记

本文采用 Mather^[7]报道的溴代琥珀酰胺(NBS)法并加以改进:以 I 为示踪物,NBS 为氧化剂:取 60 μL 10 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ KI 溶液于 1 mg 羊抗兔蛋白溶液中,然后加入 40 μL 10 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ NBS 溶液,室温振荡条件下均匀反应 2 min;用饱和酪氨酸溶液终止反应;将上述反应液在 Sephadex G50 柱内,用 PBS 淋洗,流速控制为 1.0 mL $\cdot \text{min}^{-1}$,收集数管后测收集蛋白的吸光度(280 nm)及碘的 CPS(count per second)值,制备淋洗曲线(如图 2)。图(a)中第一个峰为碘标记羊抗兔蛋白吸收峰,第二个峰为酪氨酸吸收峰;图(b)中第一个峰为标记羊抗兔蛋白上碘 CPS 值,第二个峰为游离碘 CPS 值;从图可以看出,标记蛋白和游离态碘分离比较完全,纯化彻底。

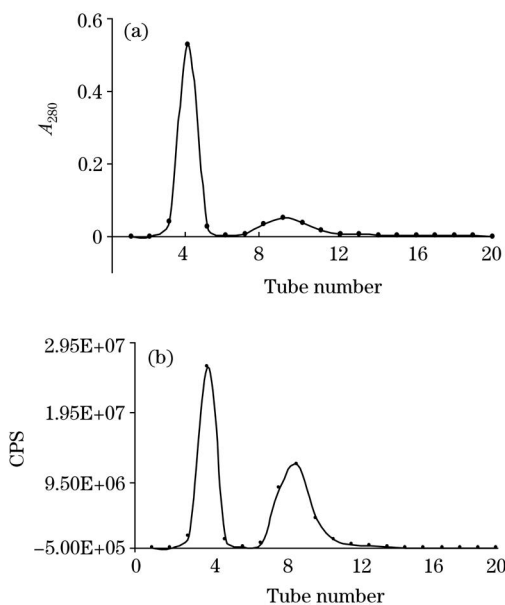


Fig 2 Elution curve of ^{127}I goat anti rabbit IgG with sephadex G50

(a): Ultraviolet Absorption of different eluting tube;

(b): CPS value of I in different eluting tube

2.2 碘标记率

将分管收集的淋洗液,经电感耦合等离子质谱检测各管溶液中碘的 CPS 值,并按下列公式计算标记率

$$\text{标记率} = \frac{I^{127}\text{-羊抗兔 IgG CPS}}{I^{127}\text{-羊抗兔 IgG CPS} + \text{游离 } I^{127} \text{ CPS}} \times 100\%$$

氧化剂 NBS 的量影响碘的标记比(如图 3),在蛋白的用量固定不变的情况下,随氧化剂 KI 氧化剂(NBS)量的增加,标记比逐渐增大,当 NBS 过量时,标记比又降低;本实验中 NBS 用量为 80 μL 时标记比最大。

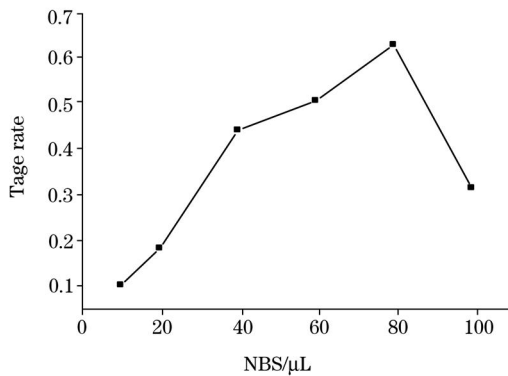
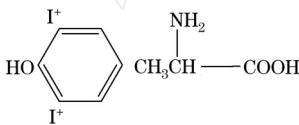


Fig 3 Effect of NBS on tag rate

I^{127} 标记的 NBS 法是基于芳香环上亲电子取代反应的原理,即氧化剂 NBS 首先将 I 氧化为 I^2 或 I^+ , 然后 I^+ 或 I^2 取代到蛋白的酪氨酸残基上, 主要因为酪氨酸残基侧链集团上的氢原子发生了置换反应, 其反应后的酪氨酸分子式表明, 碘标的位置是酪氨酸苯环上的羟基邻位产生了亲碘的取代反应。如下式,



由此, 氧化剂 NBS 的量以及蛋白分子中酪氨酸残基的数量与它们在分子中暴露的程度, 是影响标记率的关键因素。NBS 既是一种温和的氧化剂, 又更多地被用来作为溴化剂; 在蛋白的用量固定不变的情况下, 当体系中的 NBS 过量时, 它可以取代到蛋白分子上, 影响碘化反应的效率, 使标记率下降。

2.3 碘标记蛋白回收率及活性

氧化剂的用量不但影响碘标记比, 而且还影响标记蛋白的回收率(图 4)。实验中发现, 随着氧化剂的用量增加时, 蛋白回收率降低, 当 NBS 的量大于 $60 \mu\text{L}$ 时降低幅度变大; 实验中发现, 当 NBS 的量大于 $60 \mu\text{L}$ 时蛋白活性也大大降低; 主要原因是由于较过量的氧化剂破坏蛋白的结构, 影响蛋白活性。

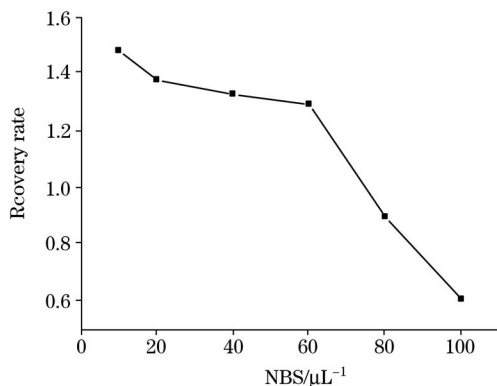


Fig 4 Effect of NBS on recovery of protein

2.4 碘标记羊抗兔蛋白稳定性

将分离纯化后的碘标羊抗兔蛋白在 4 条件下放置一定

时间后, 在 Sephadex G50 柱再进行分离, 测量碘标羊抗兔蛋白上在不同时间碘的含量, 即得到标记物的稳定性。从图 5 可以看出, 在 96 h 内 I^{127} 羊抗兔 IgG 上的碘几乎没有脱落, 标记物的稳定性较好。

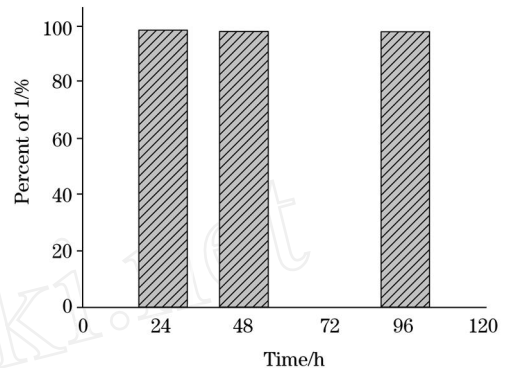


Fig 5 Stability of I^{127} Goat anti rabbit IgG

2.5 兔抗大肠杆菌的固相化

将用包被液稀释一定浓度的兔抗大肠杆菌加至聚苯乙烯微孔板孔中, 每孔 $300 \mu\text{L}$, 37°C 保温 2 h, 然后加 $300 \mu\text{L}$ 包被液, 37°C 保温 1 h 进行非特异性包被封闭; 用洗涤液洗 4 次, $300 \mu\text{L} \cdot \text{Hole}^{-1}$ (Hole 是孔), 每次静止 3 min 后再倾掉, 干燥后 4 条件下保存备用。

2.6 免疫反应实验

取 $300 \mu\text{L}$ 碘标记的 F 羊抗兔 IgG 蛋白, 加入到 2.5 中预先处理好的聚苯乙烯微孔板各孔内, 37°C 孵化 1 h 后用洗涤液洗三次; 加入 10% 的稀氨水溶液解脱标记在蛋白上的碘, 洗脱液经 ICP-MS 检测, 结果如图 6, 相关系数为 0.9985, 由此可见, 该方法能够进行免疫分析。

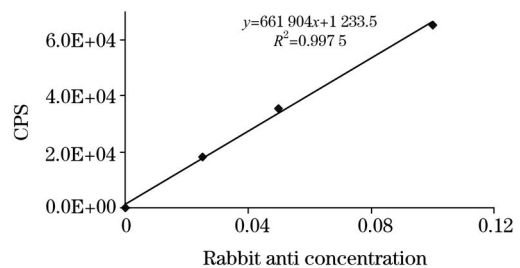


Fig 6 Curve of immunoassay

3 讨论

研究实现了非放射性碘-127 标记蛋白, 以电感耦合等离子体质谱为检测手段, 建立了一种高灵敏度的免疫检测方法。实验中采用溴代琥珀酰亚胺法实现非放射性碘-127 标记, 标记反应步骤简便, 标记率高、标记物稳定、活性好, 是一种理想的碘标记方法。碘-127 标记避免了以往的放射性碘的选择, 减少实验中放射危害; ICP-MS 是一种强有力的多元素同时分析技术; 但对于卤素, 即 Cl, Br, I 等, 由于其电离电位较高, 在氩等离子体中灵敏度都比较差, 加之样品处理复杂等因素, 所以应用报道的不多; 不过, 尽管卤素的第

一电离能比较高,如碘的第一电离能为 10.45 eV,在氙等离子体中只能达到大约 25% 的电离,但和其他分析方法相比,还是具有比较高的灵敏度;实验中采用了稀氨水洗脱碘,既

防止了碘的挥发,并能够减少了 ICP-MS 测定碘的记忆效应。

参 考 文 献

- [1] Markwell M A K. *Analytical Biochemistry*, 1982, 125: 427.
- [2] HU Ming(胡 明). *Chinese Journal of Nuclear Medicine(中华核医学杂志)*, 1986, 6(3): 200.
- [3] Goldenberg D M, Goldenberg H, Higginbotham F E, et al. *J. Clin. Oncol.*, 1987, 5(11): 1827.
- [4] Panyutin I, Neumann R. *Acta Oncol.*, 1996, 35: 817.
- [5] Dewanjee M K, Ghafouripour A K, Kapadvanjwala M, et al. *J. Nucl. Med.*, 1994, 35: 1054.
- [6] LIU Bing-chen, YUE Jing-yin, MU Chuan-jie(刘炳辰, 岳井银, 穆传杰). *Chinese Journal of Nuclear Medicine(中华核医学杂志)*, 2000, 20: 33.
- [7] Sephen J M, Bruce G W. *J. Nucl. Med.*, 1987, 28: 1034.
- [8] Creighton T E. *Protein Structure*. Oxford: IRL Press, 1989: 288.
- [9] QIAO Bir-zong, YANG Yuan, TAO Rui(谯斌宗, 杨 元, 陶 锐). *Chinese Journal of Health Laboratory Technology(中国卫生检验杂志)*, 1998, 8(5): 317.
- [10] XIAO Hui-xiang(肖惠祥). *Chinese J. Anal. Chem.(分析化学)*, 1993, 21(11): 1364.
- [11] LIU Ren-min, LIU Dao-jie, SUN Xia-ling(柳仁民, 刘道杰, 孙夏玲). *Chinese J. Anal. Chem.(分析化学)*, 1995, 23(4): 407.
- [12] GUO Zhong-xian, ZHANG Shu-yun(郭忠先, 张淑云). *Analytical Laboratory(分析试验室)*, 1995, 14(5): 31.
- [13] GONG Guo-quan(龚国权). *Chinese J. Anal. Chem.(分析化学)*, 1994, 22(5): 465.
- [14] Vanhoe H, Allemeersch F V, Versieck J, et al. *Analyst*, 1993, 118: 1015.
- [15] Larsen E H, Ludwisen M B. *J. Anal. At. Spectrom.*, 1997, 12: 435.
- [16] Cox R J, Pickford C J. *J. Anal. At. Spectrom.*, 1992, 7: 635.
- [17] Allain P, Mauras Y, Douge C, et al. *Analyst*, 1990, 115: 813.
- [18] Buchert S S A. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 1996, 354: 323.
- [19] Baumann H. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 1990, 338: 809.

Nonradioactive Iodine-Labeled Antibodies-Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry for Immunoassay

LI Jing-xi¹, WANG Xiao-ru^{1,2*}, ZHUANG Zhi-xia², CUI Wei-gang¹

1. Marine Ecology Research Center, First Institute of Oceanography of State Oceanic Administration, Qingdao 266061, China
2. Department of Chemistry, the Key Laboratory of Analytical Science of Ministry of Education, Xiamen University, Xiamen 361005, China

Abstract In the present study, the system of nonradioactive iodine-labeled antibodies linking inductively coupled plasma mass spectrometry for immunoassay was reported. The goat-anti-*Escherichia coli* and goat anti rabbit were considered as simulant antigen and antibody respectively in order to establish a new method of immunoassay by inductively coupled plasma mass spectrometry which has the advantage of high sensitivity, low detection limit and preferable linearity range. During the experiment, the N-bromosuccinimide, a mild oxidant, was used to oxidize the non-radioactive iodine (¹²⁷I) that labeled the protein. The method of nonradioactive iodine labeled protein was established and the best labeling condition was explored. The compound of I was purified by Sephadex G50 column chromatography, then the stability and activity were examined. The results showed that the labeling program was simple, reaction time was within two minutes, the labeling yield achieved 63.12% and none of I shed from the compound after 96 hours. The simulant antigen and antibody reacted on polystyrene microtiter plate and the I was detected by ICP-MS, the detection limit of the method was 0.12 mg · L⁻¹, relative standard deviation (n=9) was less than 3% and the linearly dependent coefficient was 0.9987. This system can also be used in analysis of other protein, nucleic acid and so on.

Keywords Non-radioactive iodine; Immunoassay; ICP-MS

* Corresponding author

(Received Feb. 22, 2009; accepted May 25, 2009)