

碘标记猪卵透明带抗原的稳定性研究

许贵诚 刘建中 李建生 周治发

(广东省测试分析研究所)

本工作研究了纯化的猪卵透明带抗原(PPZA)的放射性碘标记方法,比较了氯胺T法、一氯化碘法和乳过氧化物酶法制备的 ^{125}I -PPZA的免疫活性及稳定性,发现用乳过氧化物酶法制备的 ^{125}I -PPZA在稳定性和比放射性方面均优于其他两种方法,可满足猪卵透明带抗原的放射免疫测定的要求。

在放射免疫测定和示踪研究等工作中都需使用放射性标记化合物。由于制备放射性碘标记化合物经济、操作简单、测量方便,所以蛋白质和多肽类激素等标记多采用碘标记技术。目前,碘标记的常用方法有氯胺T法、一氯化碘法、乳过氧化物酶法和电解法等^[1],其中氯胺T法应用比较广泛,但在反应过程中释放出的次氯酸有较强的氧化作用,对生物活性物质的活性损伤比较严重;一氯化碘法相对比较温和,但标记产物的比放射性较低,影响放射免疫测定的灵敏度;乳过氧化物酶法是目前标记生物活性物质较好的方法,但乳过氧化物酶质量好,会直接影响标记效果。

Palm^[2]和 Subramanian^[3]等采用氯胺T法制备碘标记猪卵透明带抗原,并建立了放射免疫测定方法,但标记抗原的稳定性较差。我们在实验中也发现氯胺T法制备的碘标记猪卵透明带抗原的活性有明显损伤,且随着贮存时间的增加,抗原抗体结合率很快下降,致使放射免疫测定方法很不稳定。为选择较好的猪卵透明带抗原的碘标记方法,以制备免疫活性高、特异性强和稳定性好的标记抗原,我们对比研究了几种方法标记猪卵透明带抗原的条件及标记抗原的活性和稳定性。

材料与方 法

一、材料

1. 猪卵透明带抗原:取新鲜的成熟猪卵巢用刀片切割后依次通过孔径不同的尼龙网筛,并在解剖镜下收集包复着透明带的完整卵细胞,先后于65℃和78℃水浴分别加热30分钟,离心收集两次上清液,即为猪卵透明带全带抗原,测定蛋白含量,分装于-20℃以下冰箱贮存。

将全带抗原再经葡聚糖凝胶 G-100柱(ϕ 15×800mm)分离,得纯化的组分抗原(PPZA),测定蛋白含量(必要时先经冰冻真空浓缩),分装于-20℃以下冰箱贮存,供免疫动物和制备标记抗原。

2. Na^{125}I :中国科学院原子能研究所生产,放射性浓度为94~180mci/ml。

3. 0.05M磷酸缓冲溶液: pH7.4。

4. 0.1M Tris-HCl缓冲溶液: pH7.0

5. 氯胺T: 4mg/ml,临用前用0.05M磷酸缓冲溶液配制。

6. 偏重亚硫酸钠: 12mg/ml,临用前用0.05M磷酸缓冲溶液配制。

7. 一氯化碘: 0.42mg I^+ /ml,本实验室自制。

8. 乳过氧化物酶(简称LPO): 0.72mg/ml,本实验室从新鲜牛奶中提取纯化, $A_{412\text{nm}}/A_{280\text{nm}}=0.95$ 。

9. H_2O_2 : 0.88mM(1/10,000),临用前配制。

10. 葡聚糖凝胶 G-25 柱: $\phi 10 \times 200 \text{ mm}$, 事先用 1% BSA 0.5ml 和 0.05M 磷酸缓冲溶液平衡。

二、标记方法

1. 氯胺 T 法: 根据 Hunter 和 Greenwood 等人方法改进。取 PPZA $3 \mu\text{g}/30 \mu\text{l}$ 于反应管中, 加 0.5mci 左右的 Na^{125}I , 混匀, 加氯胺 T $80 \mu\text{g}/20 \mu\text{l}$, 振摇反应 1 分钟后加偏重亚硫酸钠 $240 \mu\text{g}/20 \mu\text{l}$ 终止反应。最后加碘化钾 $1 \text{ mg}/50 \mu\text{l}$ 作载体并立即转移至葡聚糖凝胶 G-25 柱, 分管收集淋洗液并测量各管放射性, 第一峰为 ^{125}I -PPZA, 第二峰为游离 I^- 。淋洗曲线见图 1。

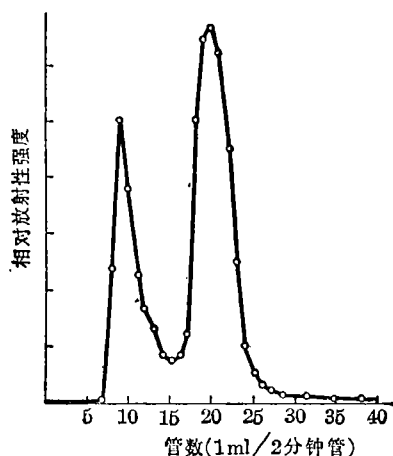


图 1 PPZA 碘化反应后在葡聚糖凝胶 G-25 柱 ($\phi 10 \times 200 \text{ mm}$) 上的淋洗曲线

2. 一氯化碘法: 取 $3 \mu\text{g}/30 \mu\text{l}$ PPZA 于反应管中, 加入 0.5mci 左右的 Na^{125}I 和 PBS $20 \mu\text{l}$, 混匀, 加一氯化碘 $50 \mu\text{l}$, 振荡反应 30 分钟后如氯胺 T 法用葡聚糖凝胶 G-25 柱分离纯化。

3. 乳过氧化物酶 (LPO) 法: 取 $3 \mu\text{g}/30 \mu\text{l}$ PPZA 于反应管中, 加入 0.5mci 左右的 Na^{125}I 和 Tris-HCl 缓冲溶液 $20 \mu\text{l}$, 混匀后再加 LPO $14 \mu\text{g}/20 \mu\text{l}$ 和 H_2O_2 $30 \mu\text{l}$, 振荡反应 30 分钟, 如氯胺 T 法上葡聚糖凝胶 G-25 柱分离纯化。

三、标记率测量

1. 凝胶过滤法: 直接根据葡聚糖凝胶 G-25 柱分离的蛋白峰和游离碘峰的放射性强度

计算。

2. 纸层析法: 预先将新华层析纸在 5% 碘化钾溶液中浸过点样部位并干燥, 反应液点样后在 5% KI: $2\text{NHCl}=1:1$ 的体系中上行展开并干燥, 用放射性薄层扫描仪测量和计算。

3. 三氯醋酸沉淀法: 取适量反应液, 并加少量蛋白作载体, 用三氯醋酸沉淀, 分别测量总放射性和沉淀的放射性, 扣除游离 ^{125}I 的载带后计算标记率。

四、 ^{125}I -PPZA 的免疫活性

用放射免疫分析方法相对测量并计算 B/F 值, 以此比较 ^{125}I -PPZA 的免疫活性大小。

实验结果

一、氯胺 T 法

我们按给定的氯胺 T 法标记程序制备 ^{125}I -PPZA, 一般标记率可达 30~40%, 比放射性约 $50 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ 左右。在一次实验中我们分别收集了蛋白峰计数较高的三管 (8, 9, 10 管), 各调节稀释至放射性相等 ($10,000 \text{ cpm}/100 \mu\text{l}$), 分别测定免疫活性并观察它们在 4°C 冰箱贮存稳定性。图 2 和图 3 分别为标记当天测定的兔抗 PPZA 血清的稀释度曲线和贮存稳定性曲线, 可见刚标记的 ^{125}I -PPZA 免疫活性较好, 与抗体的结合率 (B/F) 高, 但三管之间有一定的差异。随着贮存时间增加, 它们的免疫活性都明显降低, 其中第 8 管开始时的免疫活性较好, 下降的速度也最快。

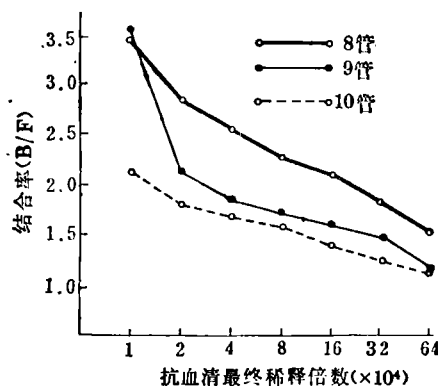


图 2 氯胺 T 氧化法制备的 ^{125}I -PPZA 测定的抗血清稀释度曲线

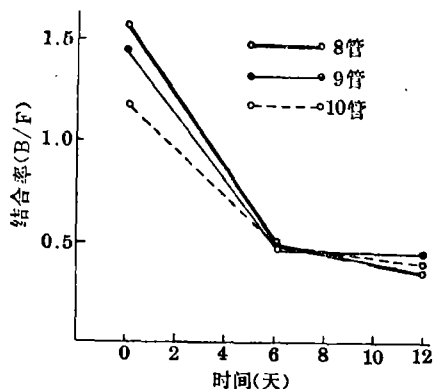


图3 氯胺T氧化法制备的 ^{125}I -PPZA 稳定性(抗血清最终稀释度 $1:1.6 \times 10^5$)

图4分别为新制备的 ^{125}I -PPZA和经 -20°C 以下冰箱贮存两周时间后的 ^{125}I -PPZA重新上葡聚糖凝胶G-25柱的淋洗曲线。新制备的 ^{125}I -PPZA的放化纯度达95%以上,而经 -20°C 冰箱贮存两周时间后的 ^{125}I -PPZA的放化纯度只有73%左右,有明显的脱标现象。贮存后免疫活性也明显降低,B/F值由原来的1.2降到0.5,重新纯化后B/F值虽可提高到0.8,仍未达到刚制备时的水平。

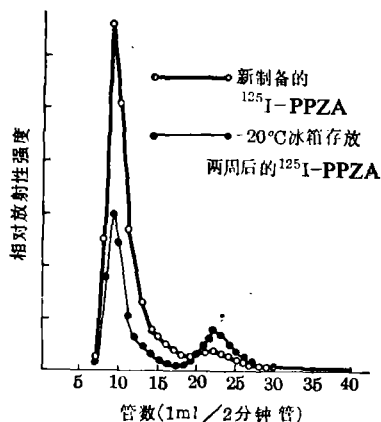


图4 ^{125}I -PPZA 在葡聚糖凝胶柱($\phi 10 \times 200\text{mm}$)上的淋洗曲线

二、一氯化碘法

以一氯化碘作反应剂时由于引入大量非放射性碘,因而产物的比放射性较低。我们按给定的标记程序制备 ^{125}I -PPZA,放射性碘的利用率一般只有5%左右,比放射性约为 $4 \sim 7 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$,但在放射免疫测定中非特异性结合低,免

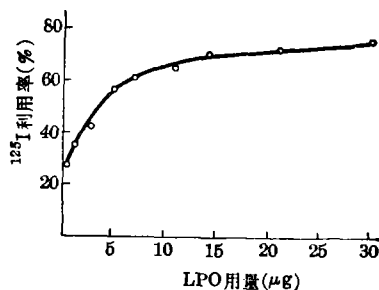


图5 LPO用量与 ^{125}I 利用率的关系,PPZA $5 \mu\text{g}$, ^{125}I $69 \mu\text{Ci}$, H_2O_2 $30 \mu\text{l}$ 反应体积 $100 \mu\text{l}$,反应时间室温30分钟

疫活性和稳定性也都比较好。

三、乳过氧化物酶法

1. LPO用量的影响:

图5表明在其他反应条件一致的情况下,随着LPO用量的增加, ^{125}I 的利用率亦随着增加,但在 $7 \mu\text{g}$ 之前增加的幅度较大,以后变化逐渐平缓。我们在实验中选用 $14 \mu\text{g}$ 。

2. H_2O_2 用量的影响:

如图6所示,当LPO用量和其他反应条件不变时, H_2O_2 的用量在 $10 \mu\text{l}$ 之前,随着用量的增加, ^{125}I 的利用率明显提高,但以后再增

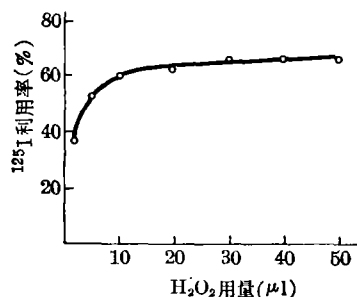


图6 H_2O_2 用量与 ^{125}I 利用率的关系,PPZA $5 \mu\text{g}$, ^{125}I $57 \mu\text{Ci}$,LPO 7Neg 反应体积 $100 \mu\text{l}$,反应时间室温30分钟

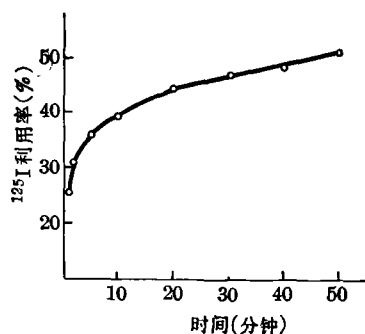


图7 反应时间与 ^{125}I 利用率的关系,PPZA $5 \mu\text{g}$,LPO $14 \mu\text{g}$, H_2O_2 $30 \mu\text{l}$ ^{125}I $240 \mu\text{Ci}$,反应体积 $100 \mu\text{l}$

大 H_2O_2 用量、 ^{125}I 的利用率变化不大。

3. 反应时间的影响:

图 7 为反应时间与 ^{125}I 利用率的关系曲线, 20 分钟以前, 随着反应时间的延长, ^{125}I 的利用率升高较快, 以后再增加反应时间, ^{125}I 的利用率增加缓慢。我们在实验中选用振荡反应 30 分钟。

我们按给定的标记程序制备 ^{125}I -PPZA, 标记率为 40% 左右, 免疫活性和贮存的稳定性均比较满意。

四、三种标记方法制备的 ^{125}I -PPZA 免疫活性和稳定性

我们用双抗体放射免疫分析方法测定了三种放射性碘标记方法制备的 ^{125}I -PPZA 免疫活性(以 B/F 值表示, 抗血清最终稀释度 $1:1.6 \times 10^5$), 并观察了它们在 4°C 冰箱贮存 40 天期间的稳定性, 结果如图 8 所示。无论那种方法制备的 ^{125}I -PPZA, 当天的免疫活性都比较满意, 与一定稀释度的抗血清结合率均比较高, 能用作放射免疫测定的标记抗原。但在 4°C 冰箱贮存的过程中, 随着时间的增加, B/F 值都会有不同程度的降低, 其中以氯胺 T 法制备的 ^{125}I -PPZA 下降得最快, 而一氯化碘法和 LPO 酶促法制备的 ^{125}I -PPZA 则相对缓慢。

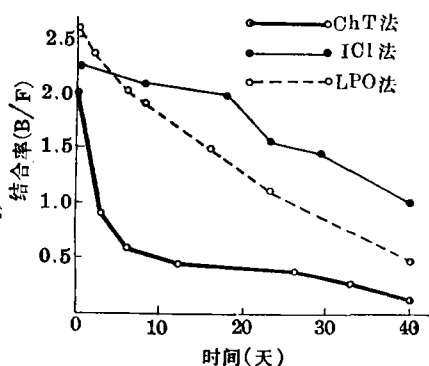


图 8 ^{125}I -PPZA 免疫活性和贮存时间的关系

讨 论

卵透明带作为免疫原所表现出的有效抗生育效果已引起国内外学者的极大兴趣^{[4][5]}。在

深入研究其抗生育作用机理、准确测定抗原活性和抗体效价等方面, 放射性示踪和放射免疫测定方法是十分有用的工具。由于放射性碘标记化合物制备简单, 测量方便, 因而大多数蛋白和多肽类化合物都采用碘标记方法。卵透明带抗原属于糖蛋白, 含有 2.4% 的酪氨酸, 可以采用直接碘化方法制备放射性碘标记化合物。Palm^[2]、Subramanian^[3]和 Gerrity^[6]等先后用氯胺 T 氧化法制备了碘标记卵透明带抗原进行示踪研究或建立了放射免疫测定方法。由于氯胺 T 遇水即释放出次氯酸, 有较强的氧化性, 对生物活性有明显的损伤作用, 特别是卵透明带抗原对氧化剂非常敏感, 因而制备的标记抗原稳定性较差。从图 8 可以看出, 氯胺 T 法制备的标记抗原贮存 3 天, B/F 值即下降 50% 左右; 从长期稳定性来看, 采用不同价态的碘自身氧化还原反应的一氯化碘制备的标记抗原最好, 贮存 16 天 B/F 值才下降 10% 左右, 但由于引入大量非放射性碘, 使放射性碘的利用率降低, 因而标记抗原的比放射性低, 用于一般示踪研究是可以的, 用于放射免疫分析则会影响到测定的灵敏度。采用微量过氧化氢存在下的乳过氧化物酶的催化氧化法是目前认为标记生物活性物质较好的碘化方法, 由于反应温和, 制备的标记物稳定性较好, 比放射性也较高。我们用自制的乳过氧化物酶研究了纯化的猪卵透明带组分抗原的标记条件, 标记抗原的稳定性虽比一氯化碘的稍差, 但明显地好于氯胺 T 法。

Subramanian 采用氯胺 T 法制备的碘标记纯化猪卵透明带抗原, 二周内结合率大约降低 3 倍, 这和我们用同样方法制备的标记抗原结果相似。而我们用乳过氧化物酶法制备的标记抗原在相同的时间内结合率仅下降 38% 左右。所以在放射免疫测定中, 氯胺 T 法制备的标记抗原仅能使用一周左右, 从而限制了方法的使用。采用乳过氧化物酶法可以明显改善标记抗原的稳定性, 有利于方法的推广和应用。

参 考 文 献

- [1] CW 帕克著 曹梅讯等译: 生物活性化合物的放射免疫测定法 第84~96页 科学出版社, 1981
- [2] Palm VS et al: *Tissue specificity of porcine zona pellucida antigen(s) test by radioimmunoassay*, Biol Reprod. 21: 709, 1979
- [3] Subramanian MG et al: *A specific radioimmunoassay for the detection of a purified porcine zona pellucida antigen (PPZA)* Biol Reprod 24: 933, 1981
- [4] Sacco AG et al: *Active immunization of mice with porcine zona pellucida: immune response and effect on fertility* J Exp Zool 218: 405, 1981
- [5] Gwatkin RBL et al: *Immunization of mice with heat-solubilized hamster zona: production of anti-zona antibody and inhibition of fertility* Gamete Res. 3: 217, 1977
- [6] Gerrity MA: *specific radioimmunoassay evaluation of serum antibodies to zona pellucida antigens* J. Reprod Immunol 3: 59, 1981 (1985年6月1日收稿)

STUDY ON THE STABILITY OF RADIOIODINE-LABELED PORCINE ZONA PELLUCIDA ANTIGEN

Xu Gue-cheng Lin Jian-zhon Li Jian-sheng Zhou Zhi-fa

(Analysis and Test Institute of Guangdong)

ABSTRACT

Purified porcine zona pellucida antigen (PPZA) was labeled with radioiodine by chloramine-T, lactoperoxidase and iodine monochloride methods. The immunoactivity and stability of the ^{125}I -PPZA labeled by the three methods were compared. Results showed that lactoperoxidase method was the best in respect of stability and immunoactivity of ^{125}I -PPZA, which should be considered suitable to be used for radioimmunoassay.

Key words: Porcine zona pellucida, Radioiodation, Stability, Immunoactivity, Radioimmunoassay

(上接27页)

THE MORPHOLOGY AND FORMATION OF MICRONUCLEI OF BLOOD LYMPHOCYTES IN MAN AFTER CESSATION OF GOSSYPOL ADMINISTRATION

Zhong Chang-qi Shi Jia-fang Liu Qi-lan

(Jiangsu Family Planning Institute, Nanjing)

ABSTRACT

Micronuclei and double-nuclei in peripheral blood lymphocytes were counted by micro-culture technique in 15 men each after cessation of gossypol administration for 2 and 11 months respectively and in 15 healthy men without gossypol. The frequency of occurrence of micronuclei in the first group was slightly higher than that of the second group but significantly higher than that in the controls. The frequency of occurrence of double-nuclei in the first group was higher than that of the controls too. The micronuclei were of two types, simple micronuclei and micronuclei with small satellites. Some micronuclei had a nucleolus-like structure and in prophase cells the micronuclei were seen to be composed of a few or over ten chromosome-like structure or their fragments. Most lymphocytes had 1~2 micronuclei, and one was seen to have 22 micronucleus-like structure.

The authors believe that not only the main nuclei can produce micronuclei, but the micronuclei may also produce mini-micronuclei. Both the main nuclei and micronuclei may form micronuclei or mini-micronuclei through the process of "exonucleosis".

The above findings indicate gossypol may induce gene breakage and affect spindle apparatus.

Key words: Micronuclei, Blood lymphocytes, Gossypol, Man