

Leu) 的受体结合活性与猪胰岛素的基本相同, 其受体结合活性是猪胰岛素的 107%。产物的生物活性为 25.6 IU/mg。这个测定结果与标准猪胰岛素生物活性也基本相同。这初步说明人胰岛素中带电荷的 A4Glu 被非极性的亮氨酸取代后, 与受体间的相互作用及其生物活性基本上都没有受到影响。胰岛素分子与受体相互作用的两性表面周围的带电荷基团和极性基团主要有 A1Gly 的 α 氨基, A4Glu, A5Gln, A18Asn, A21Asn, B9Ser, B10His, B13Glu, B21Glu, B22Arg 等残基的侧链基团以及 B 链羧端的羧基。我们将 A4Glu 改变成 A4Leu, 虽然这样会减少了一个负电荷基团, 使原有 A4 侧链羧基与 A1 α 氨基之间的盐键受到破坏, 从而使 A4 的侧链有可能更靠近疏水表面, 但由此引起的构象变化还不足以影响胰岛素分子与受体的相互作用。最近 Hua 的 NMR 工作^[7,8] 认为 A 链的 A2 与 A3 对受体识别是重要的。A3Val $\rightarrow$ Leu insulin Wakayama 突变体, 表现了 A3 的突变引起胰岛素生物活性的降低, 但却没有提到 A4Glu 残基在受体结合中的作用。

参 考 文 献

- 1 梁栋材, 常文瑞, 张季平等. 中国科学 (B 辑), 1991; 7: 715
- 2 吴凯瑾, 胡美浩. 生物化学杂志, 1989; 5: 515
- 3 Tang J G, Wang C C, Tsou C L. Biochem J, 1988; 255: 451
- 4 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning;

A laboratory manual, 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989; 1: 53—1. 67

- 5 Tang J G, Hu M H. Biotechnology letters, 1993; 15: 661
- 6 Kemmler W S, Peterson J D, Steiner D F. J Bio Chem, 1971; 246: 6786
- 7 Hua Q X, Shoelson S E, Kochoyan M *et al.* Nature, 1991; 354: 238
- 8 Hua Q X, Shoelson S E, Inouye K *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1993; 90: 1

Purification and Characterization of the Mutant of Recombinant Human Insulin (A4Glu $\rightarrow$ Leu). Chen Laitong, Tang Jianguo, Hu Meihao (*College of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871, China*).

Abstract The mutant of human proinsulin gene (A4Glu $\rightarrow$ Leu) was recombined to the expression vector and expressed in *E. coli* with high level. The expression product was purified by Sephadex G-50 gel filtration and converted to the mutant of human insulin by trypsin and carboxypeptidase B. The insulin mutant, purified by DEAE-Sephadex A-25, has an expected amino acid composition. The receptor binding activity and biological activity of this mutant are the same with that of standard porcine insulin.

Key words mutant of human insulin (A4Glu $\rightarrow$ Leu), receptor binding activity, gene expression

铀标记抗癌胚抗原单克隆抗体 C₁₇的研究和应用*

赵启仁 张福华 刘洁 林汉 李美佳 庄湘莲 陈艾 胡璧

(中国医学科学院放射医学研究所, 天津 300192)

摘要 用合成的 N'-(对-异硫氰基苄基)-二乙三胺-N¹, N², N³, N³-四乙酸铀钠为螯合剂。用 Sephadex G-50 凝胶柱层析分离标记 C₁₇ 和过量试剂。分部收集的层析物的光密度图和荧光强度图完全一致。蛋白峰处两管标记 C₁₇ 的比活性分别为 5.2 和 8.9 Eu³⁺ 离子每 C₁₇ 分子, 而且 C₁₇ 的标记回收率为 64%。标

记 C_{17} 至少在 6 个月内是稳定的. 用铕标记物得到的时间分辨免疫荧光分析的标准曲线具有良好线性和斜率, 表明标记物免疫活性良好, 而且已用于血清 CEA 分析.

关键词 时间分辨荧光免疫分析, 时间分辨免疫荧光分析, 非同位素免疫分析, 铕标记

时间分辨荧光免疫分析 (time-resolved fluoroimmunoassay, TRFIA) 是 80 年代迅速发展起来的一种公认的最有发展前途的非同位素免疫分析技术^[1]. 它用镧系元素 (以 Eu 为多) 做标志物, 用时间分辨技术测量荧光强度. 由于 Eu 螯合物具有下列优点: 激发光和发射光间的 Stokes 位移很大, 达 273nm, 前者对后者干扰很小; 发射光谱带很窄, 50% 发射光谱带宽度 < 10nm, 只测这 10nm 宽度内的信号, 本底很低; 可以反复激发, 相当于大大地提高了标记物的比活性; 特别是它的荧光寿命很长 ($\sim 1000\mu s$), 在脉冲光源激发后, 可延迟一段时间, 待短寿命本底荧光完全衰变后再测量, 极大地降低本底荧光. 所以 TRFIA 不仅灵敏度高、特异性强, 而且不用放射性核素, 试剂有效期长, 稳定和测量快速.

TRFIA 技术中, 制备比活性高、免疫活性强的 Eu 标记抗体是关键之一. 这需要经具有双功能基团结构的螯合剂, 把 Eu^{3+} 和抗体连接起来. 已用过的螯合剂有: 二乙烯三胺五醋酸酐 (DTPAA), 1-(对-重氮苄基)-EDTA, 氨基苄基-四氮杂环十二烷四醋酸, 氨基苄基-EDTA 和 N-(对-异硫氰基苄基)-DTTA^[2] 等多种. 目前国际上用的最多的是最后一种. 特别是 N¹-(对-异硫氰基苄基)-DTTA 更受欢迎, 因为它在比活性达到 15—20 Eu^{3+} 离子每 IgG 分子时, 也不影响免疫活性和在水中溶解度, 而且稳定, 在低 pH 下 Eu^{3+} 解离速度特别快, 2min 内即可完成. 最近, 国外开始出售这种化合物, 但价格贵的惊人. 为了用时间分辨免疫荧光分析 (time-resolved immunofluorometric assay, TRIFMA)^[3] 测定血清中癌胚抗原 (CEA), 用我们合成的 N¹-(对-异硫氰基苄基)-二乙三胺-N¹, N², N³, N³-四乙酸铕钠 (简称异硫氰基苄基-DTTA EuNa) 为螯合剂^[4], 进行了 Eu 标记抗 CEA 单克隆抗体 (McAb) C_{17} 的研究和应

用. 国内未见报道.

1 材料和方法

1.1 材料

异硫氰基苄基-DTTA EuNa: 本所研制. CEA: 上海瑞金医院. 抗 CEA McAb C_6 、 C_{50} 和 C_{17} : 无锡第二制药厂. Eu_2O_3 : 99.9%, Koch-Light 公司产品. 三正辛基氧化膦 (TOPO): > 97%, Fluka 公司产品. β -萘甲酰三氟丙酮 (β -NTA): 本所研制^[4]. Triton X-100: BDH 公司产品. 水: 去离子石英亚沸三蒸水. 12 孔微滴定板条: Labsystem Finland 公司产品. 增强液: 冰乙酸 0.1ml, 邻苯二甲酸氢钾 7mmol, β -NTA 15 μ mol, TOPO 50 μ mol, Triton X-100 1g, 加水至 1L. Tris-HCl 分析缓冲液 (0.05mol/L, pH7.8), 每升含 NaCl 9g, 牛血清白蛋白 5g, NaN_3 0.5g, 人丙种球蛋白 0.5g, Tween 40 0.1g.

1.2 仪器

LKB-Wallac Arcus 1230 时间分辨荧光仪. LKB-Wallac 1296-001 板式振荡器.

1.3 方法

取 C_{17} 1.1mg 置小反应杯中, 加入碳酸盐缓冲液 (0.05mol/L, pH9.6) 480 μ l, 混匀. 称异硫氰基苄基-DTTA EuNa 0.33mg 于另一小杯中, 用 50 μ l 水溶解, 再加入 50 μ l 二甲基亚砜 (因二甲基亚砜不好溶解本螯合剂), 混匀后, 也移入小反应杯中并混匀. 理论估算, $C_{17} : Eu^{3+}$ 为 1 : 61 克分子比过量. 小反应杯置 4℃ 冰箱过夜反应, 中间摇动数次.

反应液经 Sephadex G-50 凝胶柱层析, 柱床 0.7cm $\times$ 30cm. 用 Tris-HCl 缓冲液 (0.05mol/L, pH7.8) 平衡并淋洗柱床. 流速: 1ml/5min, 为 1 管. 部分收集.

为收集标记蛋白峰, 每管加入 1ml 水, 混匀. 用 UV-3000 分光光度计, $\lambda = 280nm$, 0.5cm

石英比色杯,测每管 A 值. 为同样目的,从每管取 $10\mu\text{l}$,用水稀释 101 倍,再从中取出 $20\mu\text{l}$ 加入板条孔中,加入 $200\mu\text{l}$ 增强液,慢振荡 5min,静置 10min 后,用 Arcus 1230 时间分辨荧光仪测每管的荧光强度 (见图 1).

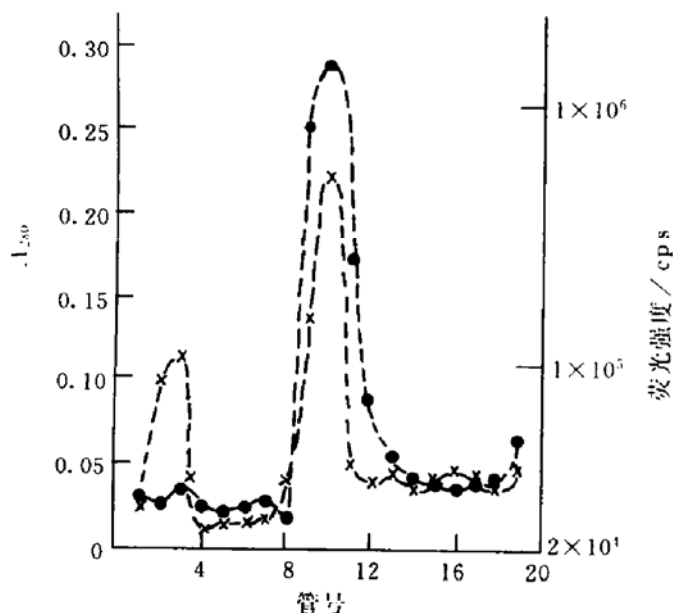


图 1 柱层析物的光吸收和荧光强度图

×---×, 光吸收, ●---●, 荧光强度.

1.3.1 标记物比活性测定 分别收集各蛋白峰. 先测定它们的 C_{17} 浓度. 所用 C_{17} 光吸收标准曲线范围为 $0.015\text{--}1.0\text{mg/ml}$, 测得标准曲线见图 2. 用测得的光吸收, 从标准曲线上查得其 C_{17} 浓度. 再测定它们的 Eu 浓度. Eu 荧光强度标准曲线的范围为 $5\times 10^{-8}\text{--}1.8\times 10^{-4}\text{mol/L}$,

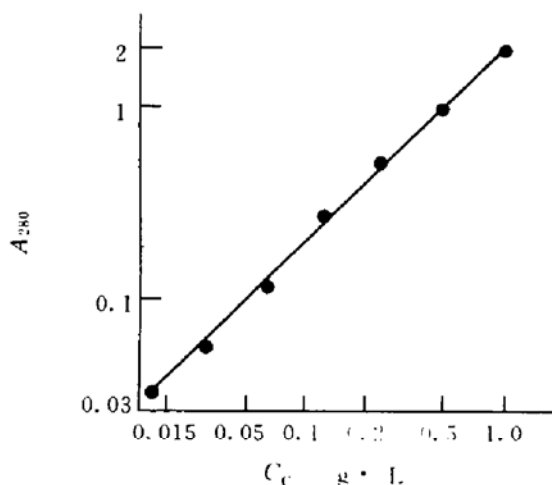


图 2 C_{17} 光吸收标准曲线

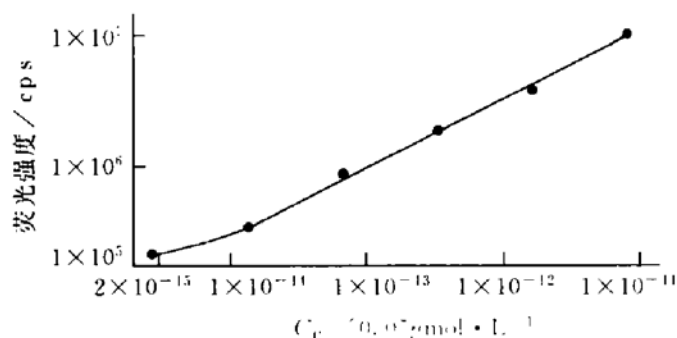


图 3 Eu 的荧光强度标准曲线

图 3 给出测得的标准曲线. 测荧光时样品的制备及测量方法与收集标记蛋白峰的相同. 用测得的荧光强度, 从标准曲线上查得其 Eu 浓度. 经单位换算后, 分别求出它们的 Eu 对 C_{17} 的克分子比.

经免疫反应检定, 第 9、10 两管为标记物 C_{17} -异硫氰基苄基-DTTA EuNa (简称 $\text{Eu}^{3+}\text{-}C_{17}$).

1.3.2 C_{17} 标记回收率的测定 用 C_{17} 光吸收标准曲线测得的第 9、10 两管的 C_{17} 总量对标记时投入的 C_{17} 量的比表示.

1.3.3 $\text{Eu}^{3+}\text{-}C_{17}$ 的保存 用 Tris-HCl 分析缓冲液稀释, 以加入载体蛋白和防腐剂. 分装为 0.5ml/管 , -85°C 冰箱保存.

1.3.4 $\text{Eu}^{3+}\text{-}C_{17}$ 免疫活性检验及应用 为节省 CEA, 直接用 TRIFMA 法检定 $\text{Eu}^{3+}\text{-}C_{17}$ 免疫活性并应用. 用 C_6 和 C_{50} 包被的板条 (用 0.05mol/L , $\text{pH}9.6$ 的碳酸盐缓冲液稀释, $C_6 : C_{50} = 3 : 7$, W/W , 每孔 $200\mu\text{l}$, 含 C_6 和 C_{50} $1.25\mu\text{g}$), 每孔加入用分析缓冲液稀释的 CEA

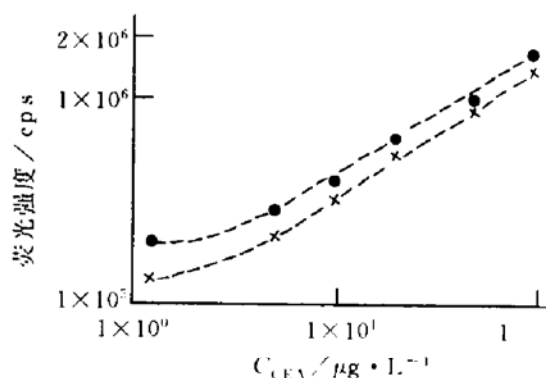


图 4 CEA 的 TRIFMA 的标准曲线

●---●: $\text{Eu}^{3+}\text{-}C_{17} 1^*$, ×---×: $\text{Eu}^{3+}\text{-}C_{17} 2^*$.

标准 50 μ l 和分析缓冲液 150 μ l, 混匀, 保温并洗涤. 加入用分析缓冲液稀释的不同浓度的 Eu^{3+} - C_{17} 200 μ l, 保温并洗涤. 每孔加入增强液 200 μ l, 振荡、静置并测荧光强度, 得 CEA 标准曲线图 4.

此外, 利用对 CEA 的 TRIFMA 的标准曲线的影响, 对包被的 McAb 的种类、浓度和封闭时间, 第一和第二次反应的温育时间, Eu^{3+} - C_{17} 浓度和分析缓冲液等主要实验条件, 进行了实验最佳化选择.

2 结果和讨论

2.1 收集标记蛋白峰

为收集标记蛋白峰, 测定了分部收集的柱层析物的光吸收图和荧光强度图 (图 1). 两个图形完全一致. 第 9、10 两管为 Eu^{3+} - C_{17} , 而在第 3 和第 25 管 (图中未画入) 附近有两个杂质峰.

这样的标记我们做了多次, 而且还做了用二乙烯三胺五醋酸酐 (DTPAA) 为螯合剂, 用 Eu 标记人血清白蛋白的实验^[5]. 都观察到柱层析物的光吸收图与荧光强度图完全一致的结果, 因此不仅可用测光吸收图的传统方法而且可用测定荧光强度图的方法确定蛋白峰, 而且后一种方法更灵敏, 这样的方法还未见报道.

2.2 Eu^{3+} - C_{17} 比活性测定

图 2 为 C_{17} 的光吸收标准曲线. 图 3 为 Eu 的荧光强度标准曲线. 测得第 9、10 两管的 Eu^{3+} - C_{17} 的比活性分别为 5.2 和 9.8 Eu^{3+} 离子每 C_{17} 分子.

虽然有文献报道, 用异硫氰基苄基-DTTA 做螯合剂, 用 Eu 标记蛋白可获得更高的比活性, 但是也有文献报道和我们实验证明, 过高的标记比活性可能影响标记物的免疫活性^[6,7].

2.3 C_{17} 的标记回收率

测得第 9、10 两管 C_{17} 总的标记回收率为 64%.

2.4 Eu^{3+} - C_{17} 免疫活性检验及应用

用 Eu^{3+} - C_{17} 做的 CEA 的 TRIFMA 的标准曲线见图 4. 图 4 中上、下两条线是分别用

Eu^{3+} - C_{17} 1* 和 2* 完成的, 2* 的浓度为 1* 的 $\frac{1}{3}$. 两线线性良好, 互相平行, 斜率适中, 表明 Eu^{3+} - C_{17} 免疫活性良好, 其它大量的实验也有同样的结果, 已应用于血清中 CEA 测定.

由图 4 可见, 到 CEA 浓度为 100ng/ml 时, 曲线仍未出现饱和趋势, 可见分析动态范围较大.

2.5 Eu^{3+} - C_{17} 的稳定性

Eu^{3+} - C_{17} 制备后, 经不同时间的 CEA 的 TRIFMA 法实验证明, 至少在半年内是稳定的.

用我们合成的异硫氰基苄基-DTTA EuNa 螯合剂标记 IgG 在国内还未见报道. 本文的成功应用是很有意义的, 因为这种螯合剂虽然近来国外已开始出售, 但异常昂贵.

用这种螯合剂标记 IgG 无毒性, 不存在废物处理问题, 而且标记物稳定. 由于标记物可在较长时间内 (半年—1 年) 使用, 可以一次较大批量制备标记物, 这在生物制剂昂贵的实验和应用中很重要.

实验中所用的 TRIFMA 法是优越的. 它具有灵敏、精密、准确、用样量小和分析动态范围宽等优点.

参 考 文 献

- 1 Diamandis E P. Clin Biochem, 1988; 21: 139
- 2 Hemmila I. Scand J Clin Lab Invest, 1988; 48: 389
- 3 Toivonen E, Hemmila I, Marniemi J *et al.* Clin Chem, 1986; 32 (4): 637
- 4 李美佳, 庄湘莲, 陈 艾等. 中国医学科学院学报, 1993; 15 (5): 353
- 5 赵启仁, 林 汉, 张福华等. 中国医学科学院学报, 1994; 16 (3)
- 6 赵启仁. 国外医学. 放射医学核医学分册, 1992; 16 (4): 182
- 7 Albertsson-Wikland K, Jansson C, Rosberg S *et al.* Clin Chem, 1993; 39 (8): 1620

Study and Application of Europium-Labeled McAb C_{17} Against CEA. Zhao Qiren, Zhang Fuhua, Liu Jie, Lin Han, Li Meijia, Zhuang Xianglian, Chen Ai, Hu Bi (*Institute of Radi-*

ation Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences, Tianjin 300192, China).

Abstract Study and application of europium (Eu) labeled mouse monoclonal antibody (McAb) C₁₇ against carcinoembryonic antigen (CEA) by using a synthesized chelate-N¹- (p-isothiocyanatobenzyl) -diethylenetriamine-N¹, N², N³, N³-tetraacetic acid Eu is described. The Eu-labeled C₁₇ was separated from excess reagent by gel filtration on a column of Sephadex G-50. The fluorescence and ultra-violet absorption for the fractions were monitored and the curves of fluorescence and the

optical density were all the same. The specific activity for the two tubes of the labeled-C₁₇ at the protein peak was 5.2 and 9.8 Eu³⁺/C₁₇ molecule respectively and the recovery of the labeled-C₁₇ was 64%. The labeled-C₁₇ was stable for 6 months at least. The standard curves of time-resolved immunofluorometric assay using the labeled-C₁₇ showed excellent linearity and slope and had been used in the assay of CEA in serum.

Key words time-resolved fluoroimmunoassay, time-resolved immunofluorometric assay, nonisotopic immunoassay, europium label

活性氧所致超氧化物歧化酶疏水性的变化*

李培峰 方允中

(军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850)

摘要 用抗坏血酸-Fe(Ⅱ)和过氧化氢分别作用于铜锌超氧化物歧化酶(SOD),经疏水层析分离得到亲水型和疏水型SOD。用胰蛋白酶和胃蛋白酶分别作用于天然SOD,亲水型SOD及疏水型SOD,结果表明疏水型SOD较亲水型SOD及天然SOD易被降解,提示活性氧氧化修饰后的SOD对蛋白水解酶敏感性提高与其疏水性增高有关。

关键词 铜锌超氧化物歧化酶,活性氧,疏水层析

生物体的许多代谢过程中伴随有O₂⁻, •OH, H₂O₂, ¹O₂等活性氧产生,铜锌超氧化物歧化酶(SOD)是清除O₂⁻的重要酶,但研究发现该酶可被其它类型活性氧(如H₂O₂, •OH等)氧化失活^[1,2],失活SOD的理化性质及结构也发生变化^[3-5]。Reiss等^[6]观察到细胞中有低活性或无活性SOD存在,这很可能与活性氧氧化损伤有关。

天然SOD不易被胰蛋白酶和细胞中内源性蛋白酶所降解,但活性氧氧化后SOD对蛋白酶水解的敏感性显著提高^[7]。目前,有关氧化损伤后SOD为何易被蛋白酶降解的机理尚未阐明。本研究将抗坏血酸-Fe(Ⅱ)和过氧化氢氧

化后SOD进行疏水层析得到疏水型和亲水型SOD,结果发现疏水型SOD易被蛋白酶降解,提示SOD易被蛋白酶降解与其疏水性增强有关。

1 材料和方法

1.1 材料

牛SOD购自甘肃夏河生物制剂厂,用前经Sephadex G-100再纯化,每毫克蛋白中酶的比活为3300 McCord-Fridovich单位,达电泳纯。胰蛋白酶和胃蛋白酶为Sigma公司产品。

*国家自然科学基金资助项目。

收稿日期:1993-12-20,修回日期:1994-03-30