

新型磁共振靶向对比剂 Gd-DTPA-链霉亲和素的制备及其反应条件的实验研究

刘 岷 袁 乙 凯 袁 其 懿 潘 一 军 医 大 学 南 方 医 院 影 像 中 心 袁 东 广 州 510515 究

摘要 目的 探讨制备 Gd³⁺ 标记的二乙三胺五乙酸-链霉亲和素 DTPA-SA 的最佳反应条件。方法 选择不同 pH 值的反应体系 pH 值分别为 5、6、7 及 8 及不同 DTPA-SA 的摩尔比率 1000、500、200、100 测定不同反应条件下的每个 SA 分子所结合的 Gd³⁺ 数目及 Gd-DTPA-SA 的结合活性。结果 随着反应体系 pH 值的增高每个 SA 分子所结合的 Gd³⁺ 数目增高。当 DTPA-SA 摩尔比率低于 500 时 DTPA-SA 联结 Gd 的数目随着 DTPA-SA 摩尔比的增高而增高。而当摩尔比率为 1 000 时则出现下降。各实验组 Gd-DTPA-SA 复合物的生物素结合活性无明显差异。结论 SA 分子所结合的 Gd³⁺ 数目依赖于反应体系的 pH 值及 DTPA 环酐-蛋白的摩尔比值。而 Gd-DTPA-SA 的生物素结合活性与反应条件无关。

关键词 二乙三胺五乙酸-链霉亲和素 磁共振对比剂 免疫成像

中图分类号 R445.2; R735.7 文献标识码 B 文章编号 000-2588(2004)01-0015-03

Preparation of a novel targeted MR contrast agent Gd-DTPA-streptavidin and exploration of its reaction conditions

LIU Xian, XU Yi-kai, HUANG Qi-liu

Medical Imaging Center, Nanfang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To explore the optimal reaction condition of DTPA-coupled streptavidin labeled with gadolinium ion. Methods The number streptavidin-coupled of gadolinium ions and maximum biotin-binding capacity of Gd-DTPA-SA complex were analyzed at different DTPA-to-SA molar ratios (1000, 500, 200, 100) and in buffer solutions of different pH values (pH 5, 6, 7, and 8, respectively). Results The number of streptavidin-coupled gadolinium ions increased with the pH value of the reaction system. When the DTPA-to-SA molar ratio was below 500, the number of gadolinium ions that SA-DTPA coupled increased with the DTPA-to-SA molar ratio, but tended to decrease when the ratio was 1 000. No significant difference in the maximum biotin-binding capacity of Gd-DTPA-SA complex was noted between the groups. Conclusion The number of gadolinium ions that streptavidin coupled depends on the pH value of the reaction system and DTPA-to-SA molar ratio, but the maximum biotin-binding capacity of Gd-DTPA-SA complex is not affected by the reaction conditions.

Key words: cyclic DTPA anhydride; streptavidin; MR contrast agents; immunoimaging

磁共振免疫成像是近年来兴起的影像学热点之一。虽然单纯使用 Gd-二乙三胺五乙酸 DTPA 单克隆抗体对比剂能够缩短靶向组织的 T1 弛豫时间而达到强化的目的。但存在着抗体用量大、增强效果欠明显等缺点。我们设想利用生物素-亲和素预定位技术用于磁共振免疫显像。先给予生物素化单抗。再注射 Gd-DTPA 标记的链霉亲和素。利用生物素-亲和素系统的高度灵敏特异性及多级放大效应。来提高磁共振免疫成像的敏感性。本研究就如何利用 Gd³⁺ 标记链霉亲和素进行研究。并探讨链霉亲和素的

最佳偶联条件。以期建立一种新型磁共振对比剂的标记方法。为肿瘤磁共振免疫成像研究打下基础。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

DTPA 环酐 渊 DTPAa 渊 sigma 公司 渊 SA 渊 sigma 公司 渊 三氧化二钆 渊 Gd₂O₃ 渊 纯度 99.9% 渊 广州市试剂中心 渊

1.2 实验方法

1.2.1 GdCl₃ 的制备 50 mg Gd₂O₃ 加入 20 ml 0.1 mol/L HCl 中。加热至 60 益。持续反应 10 min。完全溶解。蒸发多余的 HCl 即可。

1.2.2 Gd-DTPA-SA 的制备与定量测定 将 1 mg SA 加入 15 ml 的 0.1 mol/L 碳酸氢钠缓冲液。益保存。溶液的溶液内含 1/3 mg 的 SA。约相当于 5伊10⁻⁶ mmol。将 357 mg cDTPAa 渊 mmol 溶于 1 ml 的无水二甲亚

收稿日期 2003-05-26

基金项目 国家自然科学基金 渊 0371608 渊 广东省自然科学基金 渊 20053 渊

Supported by National Natural Science Foundation of China (30371608) and Natural Science Foundation of Guangdong Province 渊 20053 渊

作者简介 刘 岷 渊 974- 渊 男 渊 001 年毕业于第一军医大学。现为在读博士研究生。电话 20-61642086 渊 mail 渊 luxian@fimmu.com

取 5.0 mL 5.0 mL 5.0 mL 的上述溶液分别与上述 5 mL 的 SA 溶液混合。DTPAa-SA 摩尔比分别为 1000:500:200:100。在 4 种不同 pH 值缓冲液条件下，在 4 种不同 pH 值缓冲液内反应 1 h 后，加入制备的 GdCl₃ 溶液，络合反应在 1 min 内完成。使用离心超率法除去游离 GdCl₃，DTPA-SA 分子。

将样品送交广州科学院分析测试中心，采用高频电感耦合等离子体发射光谱法 (ICP-AES) 测量样品中的 Gd³⁺ 的含量，计算每个链霉亲和素分子上所结合 Gd³⁺ 离子的数量。

1.2.3 Gd-DTPA-SA 活性测定 采用亲和素特异活性比色测定方法。在测定比色杯中加入 Gd-DTPA-SA，使用蒸馏水调零点，测定 Gd-DTPA-SA 的 OD₂₃₃ 值。然后分次加入 0.1 mg 的生物素，测定 OD₂₃₃ 值。当吸收值不再增加时，用生物素总的量除以比色杯中 Gd-DTPA-SA 的 mg 数，即为 Gd-DTPA-SA 的活性。单位为 U/mg。

1.3 统计学分析

统计方法采用多因素方差分析。

2 结果

2.1 不同反应条件下每个 SA 分子所结合 Gd³⁺ 的数量

不同 pH 缓冲体系及不同 cDTPAa-SA 摩尔比的条件下，每个 SA 分子所结合 Gd³⁺ 的数量如表 1 所示。由表中结果可见，在 cDTPAa-SA 摩尔比一定的条件下，每分子 SA 所结合 Gd³⁺ 数量随反应体系 pH 值的增高而增高。而在反应体系 pH 一定的条件下，当 cDTPAa-SA 摩尔比低于 500 时，每个链霉亲和素分子所结合 Gd³⁺ 离子的数量随着 DTPA-SA 摩尔比的增高而增高。当 cDTPAa-SA 摩尔比为 1 000 时，又出现下降。其中以 0.1 mol/L 的碳酸氢钠缓冲液反应体系内，200 的条件下，每分子 SA 所结合 Gd³⁺ 的数目最多。与其它各组有统计学差异，P<0.05。

表 1 不同 pH 缓冲液及 cDTPAa-SA 摩尔比条件下每分子 SA 所结合的 Gd³⁺ 数目

Tab.1 Number of SA-coupled gadolinium ions at different cDTPAa-to-SA molar ratios and in buffer solutions of different pH values (Mean±SD)

pH value of buffer solution	cDTPAa-to-SA molar ratio			
	1000	500	200	100
5	8.0±2.2	10.2±6.6*	3.2±0.9	3.0±1.1
6	7.9±1.1	11.3±6.6*	6.0±0.0	4.8±1.7
7	8.6±1.4	12.4±3.3*	5.5±1.2	4.7±0.9
8	10.9±1.6	15.0±4.4*	7.6±1.2	6.4±1.8

*P<0.05 vs the other group

2.2 不同反应条件下 Gd-DTPA-SA 复合物的生物素结合活性

不同 pH 缓冲体系及不同 cDTPAa-SA 摩尔比条件下，Gd-DTPA-SA 复合物的生物素结合活性如表 2 所示。结果显示各实验组内和组间样本的生物素结合活性没有显著性差异。

表 2 不同 pH 缓冲液及 cDTPAa-SA 摩尔比条件下 Gd-DTPA-SA 的生物素结合活性

Tab.2 Maximum biotin-binding capacity of Gd-DTPA-SA complex at different cDTPAa-to-SA molar ratios and in buffer solutions of different pH values (Mean±SD)

pH value of buffer solution	cDTPAa-to-SA molar ratio			
	1000	500	200	100
5	13.1±1.0	13.2±1.8	13.5±1.4	13.7±1.1
6	13.4±0.9	13.2±1.2	13.1±1.4	13.3±1.5
7	13.5±1.2	13.6±1.8	13.4±1.6	13.4±1.1
8	13.8±1.7	14.0±1.5	13.6±1.3	13.8±1.8

3 讨论

DTPA 二胺四乙酸及其衍生物具有共价结合修饰蛋白的功能基团，具有用于放射性核素或其它物质标记的螯合基团。是常用的标记大分子物质的螯合物。

使用 DTPA 环酐完成的偶联反应为酰化反应。可发生在赖氨酸的氨基端、酪氨酸的羟基端、胱氨酸的巯基端及组氨酸的咪唑环上。形成的酰化产物中，以赖氨酸氨基端的 N-酰化产物最为稳定。巯基及咪唑环产生的酰化产物非常不稳定，易于转化为反应物。氨基酸酪氨酸羟基基团产生的 O-酰化产物也容易迅速水解。酪氨酸在反应蛋白浓度非常低的情况下，水解反应消耗了酸酐的主要部分，导致氨基端的酰化反应率较低。Sakahara 等的实验结果表明，当抗体浓度范围在 0.2~0.5 mg/ml，DTPAa-Ab 的摩尔比为 30~50 时，每个抗体分子仅可结合约 1 个 DTPA 分子。Hnatowich 等则发现当 IgG 浓度 <15 mg/ml 时，偶联效率明显下降。这一现象也见于 DTPA 环酐与白蛋白的反应。鉴于此原因，仅需结合少量蛋白时，反应体积可尽量选择较小。本实验中最大反应体积为 10 mL，链霉亲和素浓度相当于 33.3 mg/ml，收到了很好的效果。

由于连接 DTPA 与蛋白质的技术为酸酐技术，即将一个碳基转换成氨基。氨基在酸性的环境内容易与 H⁺ 离子相结合，容易降低终产物 Gd 螯合物的稳定性。故偶联反应在高 pH 缓冲液的效率更高。我们的结果表明，1 mol/L pH 为 8 的碳酸氢盐缓冲液是最佳反应体系。具有稳定的 pH 值及较高的 DTPA 偶

联率遥这是由于赖氨酸残基的着氨基基团是 DTPA 与蛋白结合的特异性反应部位^[1]遥在碳酸氢盐缓冲体系内袁当 DTPA-SA 摩尔比率低于 500 时袁A-DTPA 所结合 Gd 的数目随着 cDTPAa-SA 摩尔比的增高而增高^[2]而当摩尔比率大于 500 时袁又出现下降遥这可能是在较高的摩尔比时袁连接蛋白分子与 cDTPAa 除主要的酰胺键外袁还有一些次级键如疏水键^[3]氢键参与袁这些以次级键联结的 DTPA 很不稳定袁易解离为游离的 DTPA^[4]遥此外袁Gd-DTPA 中袁Gd 与 DTPA 有 8 个结合位点^[5]而在 Gd-DTPA 蛋白复合物中袁DTPA 只有 4 个位点与 Gd 结合袁容易降低了其稳定性遥

由于 DTPA 环酐为双环结构袁容易在双链或多个蛋白分子之间形成二聚体或多聚体袁多位学者发现随着 DTPA 结合的抗体数目增加袁其 DTPA- 抗体复合物的抗原最大结合能力出现下降^[6-8]遥但我们的结果表明袁随着 SA 结合的 Gd-DTPA 的数目增加袁其生物素结合活性并没有明显影响^[9]袁完整 SA 的生物素结合活性为 14 U^[10]袁各实验组之间没有明显统计学差异遥 Gitlin 等^[11]的实验发现袁A 的活性基团是肽链中的色氨酸残基袁当用对色氨酸特异的 Koshland 试剂处理后袁A 就丧失了和生物素结合的能力遥而本实验中的 SA 与 DTPA 连结技术主要是利用 DTPA 酸酐与 SA 分子中赖氨酸上的胺基^[12]结合的酰化反应袁且 SA 的生物素结合常数高^[13]袁抗原抗体间的 Ka 值高约 1 万以上^[14]袁故对 Gd-DTPA-SA 复合物的生物素结合活性影响较小遥

本实验结果表明袁DTPA 偶联反应依赖于反应体系的 pH 值^[15]蛋白浓度及 DTPA 环酐 - 蛋白的摩尔比值遥利用这一现象袁使用双功能整合剂进行蛋白标记快速^[16]简便袁易于野药箱化^[17]袁可用于顺磁性造影剂^[18]放射性核素的标记袁为临床提供特异有效的诊断方法遥

参考文献院

咱暂 许乙凯. 磁共振对比剂的发展概况及存在问题咱暂第一军医大学学报 002, 22(9): 769-71.

Xu YK. Contrast agents in magnetic resonance imaging: development and problems咱暂J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2002, 22(9): 769-71.

咱暂 刘 岷, 许乙凯, 黄其鏊, 等. 使用 SPIO 对大鼠肝癌模型进行 MR 增强显像的实验研究 咱暂 第一军医大学学报, 2002, 22 (12): 1061-5.

Liu X, Xu YK, Huang QL, et al. Superparamagnetic iron oxide-enhanced magnetic resonance imaging of hepatocellular carcinoma in rats 咱暂 J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2002, 22(12): 1061-5.

咱暂 Paik CH, Ebert MA, Murphy PR, et al. Factors influencing DTPA conjugation with antibody by cyclic DTPA anhydride [J]. J Nucl Med, 1983, 24 (12): 1158-63.

咱暂 Paik CH, Murphy PR, Eckelman WC, et al. Optimization of the DTPA mixed-anhydride reaction with antibody at low concentration 咱暂J Nucl Med, 1983, 24 (10): 932-6.

咱暂 Sakahara H, Endo K, Nakashima T, et al. Effect of DTPA conjugation on the antigen binding activity and biodistribution of monoclonal antibodies against 琢Fetoprotein咱暂J Nucl Med, 1985, 26 (7): 751-5.

咱暂 Hnatowich DJ, Childs RL, Lanteigne D, et al. The preparation of DTPA-coupled antibodies radiolabeled with metallic radionuclides: an improved method咱暂J Immun Methods, 1983, 65 (1): 147-57.

咱暂 Kobayashi H, Wu C, Yoo TM, et al. Evaluation of the in vivo biodistribution of yttrium-labeled isomers of CHX-DTPA-conjugated monoclonal antibody 咱暂J Nucl Med, 1998, 39 (5): 829-36.

咱暂 Paik CH, Hong JJ, Ebbert MA, et al. Relative reactivity of DTPA, immunoreactive antibody-DTPA conjugates, and nonimmunoreactive antibody-DTPA conjugates toward indium-111 咱暂 J Nucl Med, 1985, 26 (5): 482-7.

咱暂 Gitlin G, Khait I, Bayer EA, et al. Studies on the biotin-binding sites of avidin and streptavidin: a chemically induced dynamic nuclear polarization investigation of the status of tyrosine residues 咱暂 Biochem J, 1989, 259 (2): 493-8.

咱0暂Wilchek M, Bayer EA. Introduction to avidin-biotin technology 咱暂 Methods Enzymol, 1990, 184 (1): 5-13.

咱1暂Wilchek M, Bayer EA. Applications of avidin-biotin technology: literature survey咱暂Methods Enzymol, 1990, 184 (1): 14-45.

咱2暂Chen L, Schechter B, Arnon R, et al. Tissue selective affinity targeting using the avidin-biotin system咱暂Drug Dev Res, 2000, 50 (1): 258-71.

科学家合成新型氧分子

人们非常熟悉由 2 个氧原子构成的普通氧分子以及 3 个氧原子构成的臭氧分子遥意大利科学家最近合成了一种新型氧分子袁它是由 4 个氧原子构成的遥

据此间媒体报道袁0 世纪 20 年代起袁就有人预言可能存在由 4 个氧原子构成的氧分子袁但一直没有得到证实遥意大利一所大学的科学家使用普通氧分子和带正电的氧离子制造出了这种新型氧分子袁并用质谱仪探测到了它存在的证据遥这种氧分子可以稳定存在袁其具体结构还有待进一步研究遥科学家已经提出了几种关于其结构的设想袁但是每种模型都不能很好地解释实验结果遥一些专家认为袁这种氧分子把更多氧原子集中在同样大小的空间里袁因此它液化后的能量密度将高于普通液态氧袁可用作更强力的火箭推进氧化剂遥 渊新华网冤