

Feststoff-Reagenz zur schnellen Iodierung von Proteinen und Peptiden

Joyce G. Guenther, Hugh Ramsden

J. T. Baker Chemical Co. Research and Development Dept., Phillipsburg/USA

Die Radio-Iodierung von Proteinen und Peptiden (Markierung von Tyrosin-Resten mit ^{125}I oder ^{131}I) stellt eine empfindliche Methode zu deren Detektion und Quantifizierung bei biochemischen Analysen dar. Iodierte Proteine und Peptide haben sich als besonders nützlich bei drei Anwendungen erwiesen:

- Radioimmunoassay (empfindlich bis zum Picomol-Bereich)
- Untersuchung von Rezeptor-seitigen Bindungen
- Untersuchung von Metabolit-Umsetzungen (turn-over Studien).

Frühere Methoden der Protein-Iodierung sind zeitaufwendigen und weniger wirksam und erfordern gewöhnlich ein stark oxidierendes Medium. So wird beispielsweise bei der Chloramin-T-Methode (1) das starke Oxidationsmittel Chloramin-T zur Reaktionslösung gegeben und die Reaktion durch Zugabe des Reduktionsmittels Natriumhydrogensulfid unterbrochen. Die Iodierung dauert 1 Std, die Markierung ist wenig wirksam (2), und das Protein wird abwechselnd stark oxidierenden und reduzierenden Bedingungen ausgesetzt. Infolge der geringen Wirksamkeit der Reaktion werden große Mengen des γ -emittierenden radioaktiven Iods eingesetzt, so daß das Expositionsrisiko für das Laborpersonal erhöht wird.

Weiterhin wird die Chloramin-T-Methode kompliziert durch die Abtrennung des freien Iods vom iodierten Protein. Diese Abtrennung wird auf einer kurzen Chromatographiesäule durchgeführt, die zur Verhinderung unspezifischer Proteinbindung mit Rinderserumalbumin beschichtet ist. Die beschichtete Säule bewirkt häufig, daß das markierte, zu reinigende Protein mit Protein verunreinigt wird.

Ein anderes Iodierungsverfahren, die Lactoperoxidase-Methode (3) bewirkt ebenfalls recht scharfe Bedingungen, da Wasserstoffperoxid zum Auslösen der Oxidation benutzt wird. Außerdem ist diese Methode zeitaufwendig und erfordert große Mengen an Na^{125}I , um die geringe Wirksamkeit der Iodierung auszugleichen.

Mehrere Festkörper-Iodierungsprodukte sind kürzlich mit dem Ziel vorgestellt worden, die Iodierung zu vereinfachen und Reduktionsmittel zu vermeiden. Eines dieser Produkte, mit N-chlor-benzo-sulfonamid derivatisierte Polystyrolkugeln, iodieren ohne scharfe Reduktionsmittel.

Dieses Produkt erfordert jedoch auch eine Vorbereitungszeit für die Gleichgewichtseinstellung des Puffers vor der 15-minütigen Iodierungsdauer.

Ein ähnliches Produkt ist ein wasserunlösliches Pulver mit der aktiven Gruppe 1,3,4,6-tetra-chloro-3 α ,6 α -diphenylglycouril (2). Für eine wirkungsvolle Iodierung muß es auf eine große Reaktionsfläche aufgetragen werden. Die Iodierungsreaktion wird gewöhnlich in einem vorbehandelten Reagenzglas durchgeführt und durch das Abgießen der Reaktionsmischung aus dem beschichteten

Gefäß unterbrochen, wodurch Reduktionsmittel überflüssig werden. Diese Methode hat jedoch zwei Nachteile: 1. Die Vorbereitung des Reaktionsgefäßes ist zeitaufwendig, und 2. die Reaktion erfordert eine große Oberfläche (so ist z.B. für die Iodierung von 10 bis 100 μl Flüssigkeit ein Reagenzglas von 12 \times 75 mm nötig). Dadurch wird es schwierig, kleine Volumina der radioaktiven Probe quantitativ zurückzugewinnen.

Ein neues Iodierungsprodukt, das kürzlich vorgestellt wurde*, ist eine Festkörpermatrix, mit der die Nachteile früherer Methoden zur Proteiniodierung erfolgreich vermieden werden können.

Die unlöslichen Protag-125 Teilchen tragen ein fixiertes Glycouril-Reagenz. Die Reaktion ist schnell und wirkungsvoll, denn eine vollständige Iodierung wird nach nur 10 min bei 0–4°C erreicht [Abb.1 (4)]. Die Reaktionslösung wird zum Abbruch der Iodierung dekantiert oder abpipettiert, so daß scharfe Reduktionsmittel nicht mehr nötig sind. Die große Oberfläche des Reagenzes erlaubt eine wirkungsvolle Iodierung des Proteins in einem kleinem Puffervolumen ohne vorherige Gleichgewichtseinstellung oder präparative Beschichtung.

Da Protag-125 gebrauchsfertig ist, können die Iodierung und die nachfolgende Entfernung von freiem ^{125}I von 10 Proteinproben innerhalb von 25 bis 30 min erfolgen, wenn Protag-125 und ein Probenvorbereitungssystem** verwendet werden. So wurde beispielsweise Immunglobulin G (IgG) menschlichen Ursprungs mit ^{125}I nach folgender Methode markiert:

1. Eine Reaktionsmischung aus 1 mg IgG und 5 \times 10 7 cpm Na^{125}I wurde in einem Gesamtvolumen von

* Protag-125TM von J. T. Baker

** Baker-10 SPE[®] (Solid Phase Extraction)

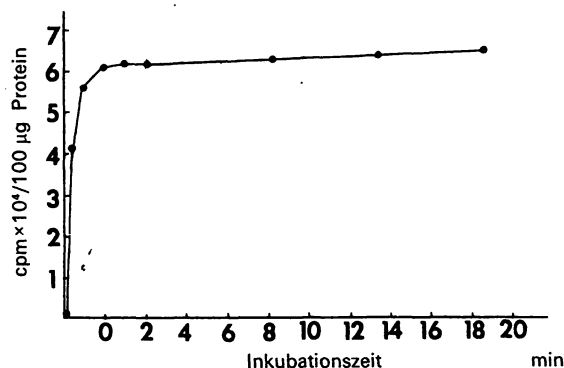


Abb. 1: Zeitabhängigkeit der Signale des an Protein gebundenen ^{125}I bei Verwendung von Protag-125

1,0 ml Puffer A (10 mmol/l Natriumborat, pH 8,2, 0,145 mol/l NaCl) herstellt.

2. Die Mischung wurde in einer Eis/Wasser-Mischung equilibriert und die Iodierung durch Zugabe von 20 mg Protag-125 gestartet.

3. Nach 10 min bei 0°C wurde die Reaktion durch Abpipettieren der Reaktionsmischung vom festen Protag-125 abgebrochen (das Dekantieren einer zentrifugierten Probe ist ebenfalls wirksam). Träger I⁻ wird für die Reaktion nicht benötigt.

Nach der Iodierung wurde überschüssiges Na¹²⁵I entfernt, indem die Lösung wie folgt über eine Dextran Gelsäule* (vernetzt) gegeben wurde:

a) Einstellung der Säule: Die 3 ml-Säule wurde mit 12 ml Puffer A eingestellt. (Dieser Schritt kann ebenfalls zur Entsalzung oder zum Pufferaustausch benutzt werden, wobei die Säule dann mit dem gewählten Puffer eingestellt würde.) Ein Trocknen der Säule wurde vermieden.

b) 200 µl der nach der Iodierung überstehende Reaktionslösung wurden auf die Säule pipettiert und diese mit 800 µl Puffer A gewaschen.

c) Dann wurde fünfmal mit 800 µl nachgewaschen und das Eluat in 1,0 ml Meßgefäßen aufgefangen.

d) Iodiertes Protein wurde durch Messung der Radioaktivität von jeder Fraktion lokalisiert und die Quantifizierung des Proteins erfolgte nach der Methode von Lowry (5).

Die Wiederfindung von ¹²⁵I-IgG betrug 90%, die von ¹²⁵I 98% (Messung der γ-Aktivität). Das Elutionsvolumen des iodierten IgG entsprach dem Totvolumen der Säulenpackung; ungebundenes Na¹²⁵I wurde später eluiert (Abb. 2).

Die Wirksamkeit der Markierung ist so groß, daß ein Überschuß an Na¹²⁵I nicht benötigt wird. Nach der Markierung von 1 mg IgG mit nur 5 × 10⁶ cpm Na¹²⁵I gemäß der oben beschriebenen Methode wurde das gesamte verfügbare ¹²⁵I an das IgG gebunden (Abb. 3); die Wiederfindung für Protein und Gesamtradioaktivität war wieder größer als 90%.

Das Reagenz Protag-125 bietet erhebliche Vorteile gegenüber anderen methodischen Ansätzen zur hochwirksamen Markierung von Proteinen mit radioaktivem Iod. Die unlösliche Matrix von Protag-125 hat eine größere Oberfläche für die wirkungsvolle Iodierung als derivatisierte Kugeln; Protag-125 benötigt weder eine zeitraubende Beschichtung, mit der das Oxidationsreagenz der Reaktionsmischung zur Verfügung gestellt wird, noch eine Gleichgewichtseinstellung dieses Mediums vor der Iodierung. Demzufolge können mehrere Iodierungsreaktionen an einem Tag durchgeführt werden, und zwar dann, wenn die spezifische Aktivität des Isotops am höchsten ist. 10 Proben können innerhalb von 25 bis 30 min iodiert werden und sind gebrauchsfertig.

Protag-125 ermöglicht milde Bedingungen für die Oxidation, mit der die Tyrosinreste des Proteins wirksam iodiert werden. Infolge der Unlöslichkeit der Matrix kann die Reaktion durch einfaches Dekantieren der Reaktionslösung von der Matrix abgebrochen werden.

Durch die Reduzierung der Reaktionszeit und der einzelnen Reaktionsschritte sowie durch die Verringerung von Größe und Menge der erforderlichen Glasgeräte wird

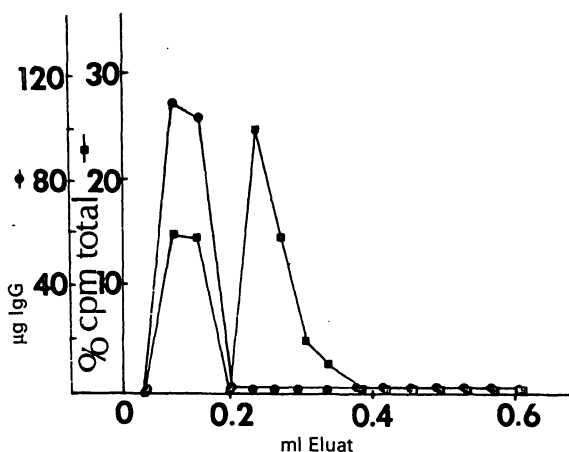


Abb. 2: Trennung des mit Protag-125 iodierten IgG menschlichen Ursprungs von ungebundenem ¹²⁵I an einer Dextran Gelsäule*

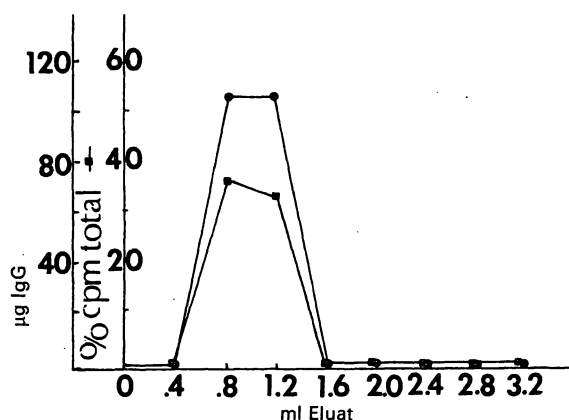


Abb. 3: Ohne überschüssiges Na¹²⁵I markiertes ¹²⁵I IgG an einer Dextran Gelsäule*

schließlich das Laborpersonal erheblich weniger der Radioaktivität ausgesetzt. Das kleine Reaktionsvolumen, das für die Iodierung nötig ist und die sehr gute Wiedergewinnung von radioaktivem ¹²⁵I bewirken eine geringere Menge an radioaktivem Abfall.

Schrifttum:

1. HUNTER, W. M., GREENWOOD, F. C.: Nature 194, 495 (1962).
2. FRAKER, P. J., SPECK, J. C., jr.: Biochem. Biophys. Res. Comm. 80 (4), 849 (1978).
3. PHILIPS, D. R., MORRISON, M.: Biochem. 10, 1766 (1971).
4. LATHAM, K.: Privatmitteilung.
5. LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L., RANDALL, R. J.: J. Biol. Chem. 193, 255 (1951).
6. GUENTHER, J. G., RAMSDEN, H.: American Biotechnology Laboratory März 1984.

Anschrift der Verfasser:

J. C. Guenther
Dr. Ramsden
J. T. Baker Chemical Co.
Phillipsburg, N.J. 08865 USA
Research and Development Dept.

* Baker-10 SPE® (SOLID PHASE EXTRACTION)