DOI: 10.16016/j.1000-5404.1997.05.042

神经肽 Y放免方法的建立

The establishment of neuropeptide Y radioimmunoassay

曾春雨* 刘光耀 王旭开 程绍钧** 张光运** (第三军医大学附属大坪医院心血管内科) 重庆,400042

提 要 目的:建立神经肽 Y(NPY)的放免分析法。方法:利用 Iodogen法标记 NPY,制得高比活度的^{125}I-NPY,在此基础上建立了 NPY的放免测定法。结果:此法非特异性吸附率 5.3%、血样品回收率 92%、批间平均变异系数 8.1%,与相关肽之间无交叉反应。结论:本实验建立的 NPY放免分析法敏感性高、特异性强,是一种值得推广的 NPY的放免分析法。

神经肽 Y(NPY)是一种含有 36个氨基酸的多肽,它广泛地分布于中枢神经系统和外周组织器官中,发挥着重要的作用[1,2]。本实验利用国产同位素、进口 NPY抗体及标准品建立了 NPY的放免分析法,并成功地应用于大鼠血 NPY含量的测定,为以后开展 NPY的研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

NPY、促肾上腺皮质激素(ACTH)、促甲状腺激素(TSH)、血管紧张素Ⅱ(AⅡ)均为 Sigma公司产品;NPY抗血清为宝灵曼公司产口;Na^{125}I 为北京原子能所生产;Sep-Pak C18购自上海试剂商店(进口分装);羊抗兔 IgG抗血清购自北京华美生物公司。

1.2 方法与步骤

1.2.1 血样预处理 取血时将试管置于冰浴中,取血完毕后立即加入 10% 乙二胺四乙酸(EDTA)10μl/ml血和抑肽酶 500kIU/ml 血混匀,4℃下 1500× g 离心 10 min,取上清液 -30℃冻存备用。

1.2.2 NPY碘标记[3] 在涂有四氯二苯丁脲(Iodogen)的聚丙烯塑料管中加入磷酸盐缓冲液(PBS)40μl(pH7.4,0.1)、标准 NPY10nmol、5 mCiNa^{125}I 混匀,24℃下反应 5 min,在此期间温和地混匀震荡数次后再加入 PBS 150 ml终止反应,此稀释液在室温下继续静止 10 min,静止完毕后立即将反应液移入已有 5% 牛血清白蛋白 200 ml的试管中,混匀,上 Sep-Pak C18柱,分离标记的 NPY,用 0.027mol/L甲酸(内含 0.2% 牛血清蛋白、0.02% 叠氮钠洗脱,流速 0.1ml/min,5 min收集 1管,共收集 80管,分别取 100μl进行放射性测定,画出洗脱曲线,蛋白峰各管取样行放射免疫活性测定,余贮存于 -20℃冰箱中备用。

1.2.3 NPY放免法的建立 按表 1所列步骤进行 NPY放免测定[4],所有测定样品均做复管。

表 1 NPY放免分析的基本步骤 单位(μl)

反应物	T管	N管	B$_0$管	B管
NPY抗血清(1:10000)	0	0	100	100
NPY标准品	0	0	0	100
缓冲液(pH7.4 PBS)	0	200	100	0
	4℃	24 h		
^{125}I-NPY(1000 cpm△)	100	100	100	100
	4℃	24 h		
羊抗兔抗血清(1:20)	100	100	100	100
混匀后,室温30 min,4℃ 3000× g,离心 10 min,去上清,取沉淀,γ计数				

注:B管包括标准管及样品管

2 结果

2.1 ^{125}I-NPY的分离及鉴定

^{125}I-NPY分离结果见图 1,^{125}I-NPY蛋白峰与游离峰分离良好,收集^{125}I-NPY蛋白峰,分装冻存,-30℃条件下至少可用四周。本实验碘利用率 35%、标记比活度 3.367MBq/μg 游离碘 4%。

^{125}I-NPY与 NPY抗血清结合率 96% (抗血清稀释度 1:200)且稳定性好,置 -20℃下贮存 2月,仍保持其原有的免疫活性。

2.2 NPY放免方法的建立

NPY标准曲线见图 2,NPY在 1.95 fmol至 2000 fmol之间与抑制率呈线性关系。竞争抑制试验显示与其相关肽(ACTH、TSH、AⅡ)之间无交叉反应,结果与已知资料比较见表 2。测定 Wistar大鼠和正常成年人血中 NPY含量,前者为 743± 22 fmol/ml,后者为 19.2± 5.6fmol/ml。

* 曾春雨,男,28岁,住院医师,硕士
** 第三军医大学医学检验系核医学教研室 重庆,400038

△ cpm现已不用,1 cpm= 75%× 60 Bq= 45 Bq

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

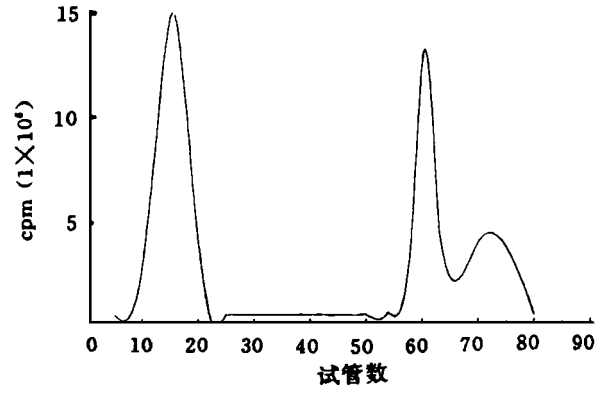


图 1　^{125}I标记 NPY Sep-Pak C_{18}柱分离图

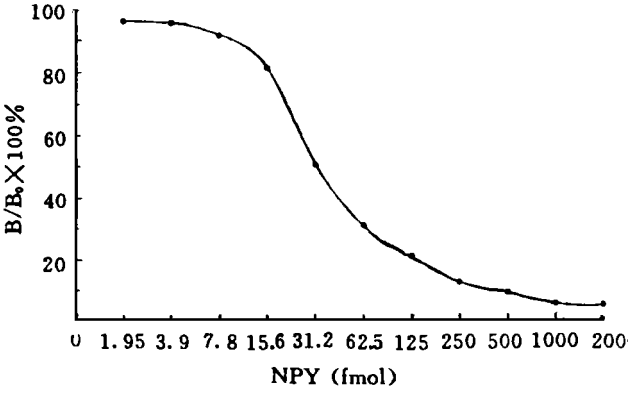


图 2　NPY放免分析标准曲线

表 2　与国内外 NPY放免测定法各指数比较

指标	本实验	国内[4]	国外[3]
最小检测范围(fmol)	1.95~3.90	3.53~4.70	1.88~2.82
血浆回收率	92%	90%	95%
批间变异系数	8.1%	9.5%	10%
非特异性结合率	<5.3%	<6.2%	<5%

3　讨论

NPY的作用越来越受到人们的重视。国外 NPY的放免测定方法报道较早[3],但从国外订购试剂有诸如价格昂贵、手续繁琐、周期长等缺点,限制了国内对 NPY作用的进一步深入研究,国内近年来亦有 NPY放免方法的报道[4],但为氯胺丁法,标记率低,比放射活性低,降低了 NPY放免分析的敏感性。

本实验应用国产同位素、进口 NPY抗体及 NPY标准品,利用 Iodogen法标记 NPY,制得了高比活度的^{125}I-NPY,在此基础上建立了 NPY放免分析法。竞争抑制分析法证明与相关肽之间无交叉反应,说明其特异性强,本实验 NPY的最小检测范围为 1.95 fmol至 3.9 fmol,明显优于国内在氯胺丁法基础上建立的方法,与国外同类方法的敏感性相当。血浆回收率为 92%、批间变异系数 8.1%符合一般放免分析的要求。与已知资料比较提示本法是一种敏感性高、特异性强的放免分析。

NPY碘标记的主要体会有:标记同位素应具有较高的放化纯度,同位素应尽量新鲜,否则放化纯度下降,不易制得高比活度的标记物。Iodogen与抗原的比例要适宜,Iodogen用量过大会引起抗原氧化损伤,使标记率反而下降,本实验参照 Sheikh等[3]采用的比例(1∶2)证明是适当的。Iodogen涂管对标记同样有影响,Iodogen涂管应以固体物均匀分散于试管底部为宜。另外欲使涂管面积均匀,最好采用恒定负压的真空泵吹干,此法不仅效果好而且易于掌握,值得推广。碘化反应在室温下进行即可,反应时间控制在 5~10 min之间为佳,不宜超过 15 min,否则氧化时间过长标记率反而下降。在进行 Iodogen碘化反应时宜采用温和地搅动,但次数不宜过多。Iodogen法是一种简便、高效的标记方法,它不直接与溶液中标记蛋白分子接触,减少了对标记物的直接损伤,反应温和,反应时间相对延长,易于掌握。

关键词　神经肽 Y;放免测定
中图法分类号　Q516

参考文献

1 Wettstein J G, Earley B, Junien J L. Central nervous system pharmacology of neuropeptide Y. Pharmac Ther, 1995, 65(3): 397

2 McDermott B J, Millar B C, Piper H M. Cardiovascular effects of neuropeptide Y receptor interaction and cellular mechanisms. Cardiovasc Res, 1993, 27(6): 893

3 Sheikh S P, O Hare M M T, Tortora O *et al*. Binding of monoiodinated neuropeptide Y to hippocampal membranes and human neuroblastoma cell lines. J Biol Chem, 1989, 264(12): 6648

4 杨竞平,杨贵贞.神经肽 Y放免分析法的建立.中国免疫学杂志, 1991, 7(4): 199

(收稿: 1996-12-15;修回: 1997-03-19)
(编辑　冷怀明)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net