

Rádioimunoanalýza

E. Žitniaková, M. Pivková

Evanjelické gymnázium Banská Bystrica, Skuteckého 118/5

erika.zitniakova14@gmail.com, martina.pivkova@gmail.com

Abstrakt:

Základom rádioimunológie je imunochemická reakcia antigénu so špecifickou protilátkou označenou rádionuklidom. Táto metóda sa používa v klinických oblastiach endokrinológie, toxikológie, imunológie a mnohých ďalších. Hlavnou úlohou nášho projektu bolo zistiť koncentráciu hormónu hCG pri neznámych vzorkách na základe zostrojenia kalibračnej krivky.

1. Úvod

Technika rádioimunoanalýzy je veľmi často používaná v medicíne na stanovenie rôznych hormónov a antigénov v biologických materiáloch ako napr. krvné sérum, mozgovomiechový mok alebo moč.

Imunorádioizotopové metódy sa vyznačujú vysokou citlivosťou a špecifickosťou. Citlivosť je na úrovni nanogramov až pikogramov. Ďalšou výhodou je, že na analýzu je potrebné veľmi malé množstvo vzorky a praktické prevedenie je relatívne jednoduché. Na druhej strane nevýhodou môže byť, že špecificita môže byť ovplyvnená konkurenčnými imunochemickými reakciami. Taktiež biologická aktivita a imunoreaktivita molekuly môže byť znížená z dôvodu vlastnej inkorporácie rádioaktívnej zložky.

Pri metóde RIA máme stanovenú látku X, špecifickú protilátku A a rádioaktívne označenú látku X*. Premiešaním roztoku vzniká komplex A-X alebo A-X*. Rovnovážne konštanty sú v oboch prípadoch rovnaké. Čím vyššia bude koncentrácia pridanej látky X, tým bude menšia koncentrácia X* a namerané hodnoty rádioaktivity budú tiež klesať.

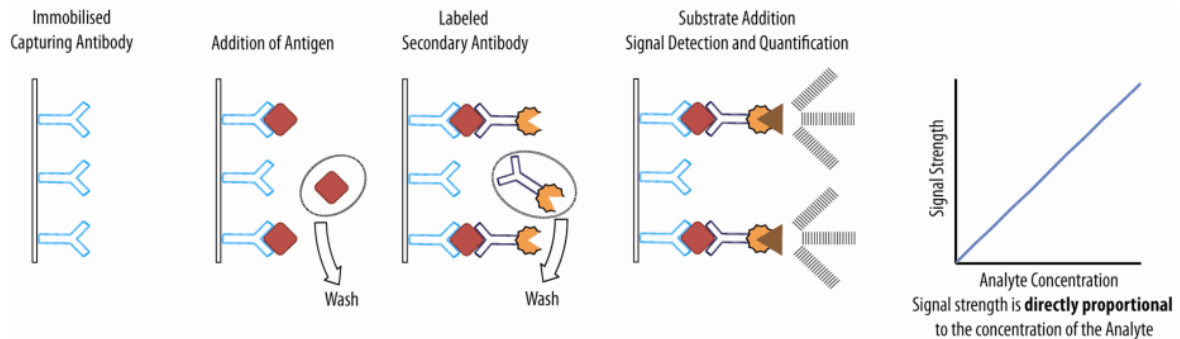
Okrem RIA metódy existujú ešte modifikácie tejto metódy. Jednou z často používaných metód je IRMA. Rozdiel medzi klasickou RIA metódou a IRMA spočíva v tom, že pri IRMA používame dve protilátky. Jedna protilátka je neoznačená a nachádza sa na stene skúmavky A a druhá protilátka je rádioaktívne označená A*. Po pridaní stanovovanej látky X vzniká komplex A-X, potom sa pridáva označená protilátka A* a vzniká tzv. sandwich A-X-A*. Na rozdiel od metódy RIA v tomto prípade aktivita so zvyšujúcou sa koncentráciou látky X rastie. Túto metódu sme použili pri našom meraní, jej nevýhodou však je, že izolácia a príprava rádioaktívne označenej a neoznačenej protilátky sú náročné.

Na označenie protilátok sa používajú rádionuklidy, hlavne ^{125}I , ^3H , ^{14}C . V našom prípade bol použitý ^{125}I , z dôvodu jeho vysokej schopnosti viazať sa na organické zlúčeniny a dlhému polčasu rozpadu, ktorý je okolo 60 dní. Pri tejto úlohe sme stanovovali hormón hCG

(Choriogonadotropin), ktorý sa používa pri diagnostike tehotenstva a naznačuje správny vývoj zárodka.

Obrázek 1 sandwich komplex

(http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/print.php?page=2613&typ=html)



2. Materiály a metódy

K dispozícií sme mali kalibrátory obsahujúce hormón hCG 0,1,2,3,4,5, neznáme vzorky C1, C2, rádioaktívny indikátor, a skúmavky, ktoré mali povrch potiahnutý tenkým filmom protilátky.

Tabulka 1 zadané hodnoty koncentracií hCG pre jednotlivé kalibrátory

Kalibrátory	Koncentrácia hCG (IU/L)
0	0
1	8,20
2	27,4
3	82,0
4	274
5	820

Do pripravených skúmaviek sme dávkovali 50 μ L hCG a následne sme pomocou pipety pridali 200 μ L rádioaktívne označenej protilátky. Rádioaktívnu protilátku sme pridali aj do skúmavky T, do ktorej nebolo pridané hCG.

Potom boli skúmavky inkubované na orbitálnej trepačke. Inkubácia trvala 45 minút za stáleho miešania (>280 kmitov/min.) pri teplote 20-25 °C.

Po inkubácií sme obsah skúmaviek vyliali a pomocou pasteurovej pipety odsali zvyšok kvapaliny. Výnimkou bola skúmavka T, ktorá slúžila na stanovenie celkovej aktivity. Následne sme do skúmaviek priliali 2 ml premývacieho roztoku, ktorý bol opäť odsatý. Posledným krokom postupu bolo meranie početnosti (počet impulzov za sekundu). Okrem ôsmich skúmaviek bolo merané aj pozadie pričom všetky merania prebiehali trikrát a následne boli zpriemerované (Tab.2).

3. Výsledky a diskusia

Tabulka 2 Výsledky meraní počtu impulzov za sekundu[cps]

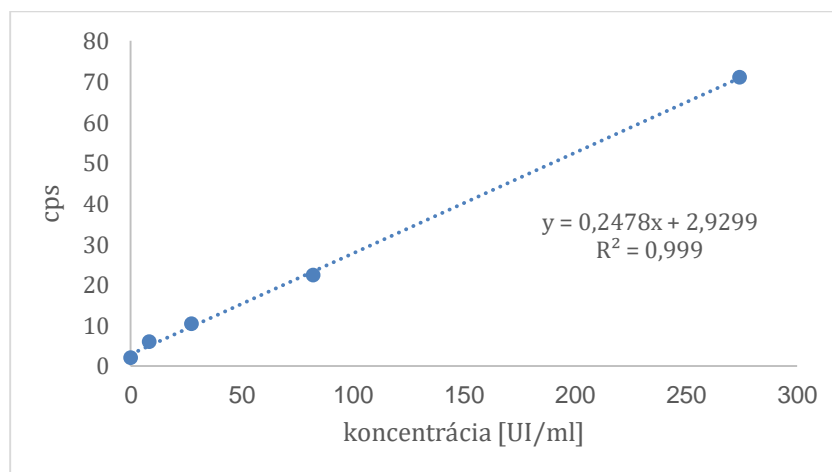
	1.meranie(cps)	2.meranie(cps)	3.meranie(cps)	Priemer(cps)
Pozadie	19	19	20	19,34
T	107	107	106	106,67
0	22	21	21	21,34
1	27	25	25	25,67
2	29	29	30	29,34
3	42	41	42	41,67
4	79	80	82	80,34
5	147	153	150	150
C1	27	27	25	26,34
C2	61	59	59	59,67

Z nameraných hodnôt sme odpočítali priemer pozadia a získali sme hodnotu počtu impulzov za sekundu(cps) (Tab.3). Pomocou týchto informácií sme zostavili graf závislosti koncentrácie hCG na cps. Do grafu sme nezahrnuli hodnoty skúmavky 5, z dôvodu veľkej odchýlky. Po jej vyčlenení sme získali lineárnu závislosť. Na záver sme vďaka rovnici regresie získanej z grafu, vypočítali koncentrácie hCG neznámych vzoriek.

Tabulka 3 Vypočítané hodnoty experimentu

	c[UI/ml]	logc	cps	B/T
0	0	0	2	0.003125
1	8.2	0.913814	6	0.009375
2	27.4	1.437751	10.34	0.016156
3	82	1.913814	22.34	0.034906
4	274	2.437751	71	0.110938
5	820	2.913814	130	0,204172

Graf 1 Závislosť koncentrácie hCG na cps



Výpočty koncentrácie hCG neznámych vzoriek:

$$Y=0.2478x+2.9299$$

$$C1: 7-2.9299/0.2478=16.42494$$

$$C2: 40.34-2.9299/0.2478=149.5969$$

4. Zhrnutie

Vďaka tomuto projektu sme mali možnosť si vyskúšať prácu s IRMA imunorádioizotopovou metódou. Výsledkom experimentu bolo zistenie koncentrácie hCGv neznámych vzorkách. Vo vzorke C1 s 26,34 cps bola koncentrácia hCG 16,42 UI/ml a vo vzorke C2 s 59,67cps bola koncentrácia 149,6 UI/ml. K výsledkom sme sa dopracovali pomocou kalibračnej krivky.

5. Pod'akovanie

Naša vďaka patrí vedúcemu nášho projektu Ing. Michalovi Sakmárovi za pomoc a podporu. Ďalej by sme sa chceli poďakovať všetkým organizátorom Týdne vedy na Jaderce 2019 obzvlášť Ing. Kateřine Jirákovéj a hlavnému organizátorovi Ing. Vojtěchovi Svobodovi, CSc za poskytnutie priestoru pre rozvoj mladšej generácie.

6. Referencie

- [1] COLE, L.A. Quantitative hCG Assays. Human Chorionic Gonadotropin [online]. Elsevier, 2010, [cit. 2017-06-20]. ISBN 9780123849076. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123849076000190>
- [2] Imunoreakce se značenými protilátkami URL: <http://imunologie.lf2.cuni.cz/soubory_vyuka/imunoreakce.pdf> > [cit. 2019-06-18]