

Radioimunoanalýza

N. Hrobařová, První soukromé jazykové gymnázium, Hradec Králové

M. Osowski, První soukromé jazykové gymnázium, Hradec Králové

Janka Motešická, Gymnázium vo Vranove nad Topľou

Zuzana Petrová, Gymnázium vo Vranove nad Topľou

Filip Jozefov, Gymnázium vo Vranove nad Topľou

V. Löffelmann, Gymnázium Litoměřická

hrobarova.nela@psjg-hk.cz

Abstrakt

V rámci našeho projektu jsme zvolili radioimunoanalytickou techniku, která se využívá v lékařství. Základním principem je imunochemická reakce antigenu se specifickou protilátkou, která je značená radionuklidem, v našem případě ^{125}I . Výsledkem práce je stanovení koncentrace antigenu za pomoci kalibrační křivky, která byla sestavená na základě roztoků o známé koncentraci.

1. Úvod

Radioimunoanalýza (RIA) zahrnuje metody radioizotopové mikroanalýzy, jejichž základem je imunochemická reakce antigenu se specifickou protilátkou. Tato metoda se provádí *in vitro* v přítomnosti vhodné radioaktivně značené sloučeniny jako radioindikátoru, který umožňuje kvantitativní stanovení na základě určení distribuce aktivity. Jedná se o kompetitivní imunoreakci, kde značený antigen soupeří s neznačeným antigenem o vazebná místa na protilátce. Radioimunologické metody jsou význačné svojí přesností a citlivostí (citlivost se pohybuje mezi ng a pg), díky tomu pro stanovení stačí malé objemy vzorků (10 – 100 μl). Lze s jejich pomocí teoreticky stanovit každou látku, ke které lze připravit odpovídající protilátku. Konkrétní antigeny lze stanovit ve vzorcích krve, moči, mozkomíšního moku a dalších tělních tekutin.

Nevýhodou však je, že specifita nemusí být absolutní, mohou se vyskytovat konkurenční imunochemické reakce (zkřížená reaktivita). Také je nutné vzít v potaz, že protilátky jsou látky s biologickou aktivitou, která disipuje v přítomnosti zdroje ionizujícího záření. Toto je především v důsledku radiolytických procesů, vedoucích k modifikaci, či destrukci použitého skeletu.

Ke značení se nejčastěji používají radionuklidy ^{125}I , ^3H , ^{14}C . V našem případě byl použit ^{125}I , vzhledem k vysoké schopnosti se navázat na organické sloučeniny a dlouhému poločasu rozpadu (59 dní). Zkoumali jsme dva hormony, a to: AFP (Alfafetoprotein) a hCG (Choriogonadotropin) – hormony vyskytující se při těhotenství a určující správný vývoj plodu.

2. Princip (RIA, IRMA)

RIA

Při této metodě používáme látku X , proti které máme stanovenou specifickou protilátku A a radioaktivně značenou látku X^* .

Při smíchání A , X vznikne specifický komplex $A - X$, v případě značené látky analogicky komplex $A - X^*$, přičemž rovnovážné konstanty pro oba děje jsou shodné. Pokud tedy připravíme komplex $A - X^*$ a k němu přidáme roztok obsahující stanovovanou látku X dojde k vytěsnění části molekul X^* a tím pádem vznikne z původního $A - X^*$ komplex $A - X$. Čím vyšší bude koncentrace přidané látky X , tím menší hodnota radioaktivity bude obsažena v komponentách obsahujících protilátku, které nakonec slouží k vlastnímu vyhodnocení.

IRMA

IRMA (imunoradiometrická analýza), je metoda podobná RIA, ale rozdíl je v tom, že IRMA využívá dvou protilátek (neznačené a další značené radioaktivním izotopem ^{125}I), k zjištění koncentrace hormonu ve vzorku. Po přidání vzorku do zkumavky obsahující neoznačené protilátky se stanovovaná látka imobilizuje navázáním na protilátky, které jsou na stěně zkumavky. Tímto procesem vzniká komplex látka-protilátka. Po odsátí zbytku měřeného roztoku se do zkumavky přidá roztok se značenými protilátkami, které reagují s předtím vzniklými komplexy tak, že na každý komplex se naváže právě jedna značená protilátka. Tím pádem je možné, z množství navázaných značených protilátek, určit pomocí měření radioaktivity, jaká je koncentrace stanovované látky.

3. Postup

Prvním krokem bylo umístění 8 zkumavek do stojánku. Všechny zkumavky (T, C, K1 – K5/K6) obsahovaly protilátku proti hCG/AFP. Do zkumavek K1 – K5/K6 jsme přidali 50 μl kalibrátoru (roztok se známou koncentrací hCG/AFP). Nakonec jsme do všech zkumavek přidali radioindikátor. Vše jsme promíchali na vibrační míchačce a vložili na třepačku. Tam jsme zkumavky inkubovali po dobu 45 minut.

Po inkubaci jsme ze zkumavek K1 – K5/K6 a neznámého vzorku C odsáli kapalinu a pipetou přidali 2 ml promývacího roztoku. Kapalinu jsme poté opět do sucha odsáli. Ve zkumavce T zůstal roztok, který sloužil k výpočtu.

Na měřicí soupravě se stanovovala hodnota pozadí. Poté jsme provedli samotné měření zkumavek. Každou zkumavku jsme měřili 3 krát po dobu 60 sekund. Získané hodnoty jsou uvedené v tabulce (Tab. 1 – 4). Uvedené hodnoty jsou zapsány již s odečteným pozadím (17 cps). Pro demonstraci vytvořila každá skupina graf s jinou závislostí. První skupina, která měla AFP (Alfafetoprotein), na ose X vynesla logaritmus koncentrace (UI/ml) a na ose Y bylo procento navázané aktivity (vazebnost). Vazebnost jsme zjistili z hodnoty počtu impulsů (B/T), kde B je aktivita vázaná na protilátku, T je celková aktivita. Druhá skupina měla hCG a na ose X vynesla koncentraci (UI/l) a na ose Y byla vazebnost v procentech. Koncentrace neznámých vzorků byly spočítány na základě regresních rovnic, které jsou uvedené v grafech (Graf. 1,2).

4. Výsledky

První skupina

Tabulka 1 Naměřené aktivity experimentu 1 (cps – počet impulzů za sekundu)

	koncentrace [UI/ml]	1. měření [cps]	2. měření [cps]	3. měření [cps]	průměr [cps]
K1	0	2	1,0	0,0	1,0
K2	4,9	12	14,0	13,0	13,0
K3	20,4	36	35,0	36,0	35,7
K4	90,0	125	127,0	121,0	124,3
K5	218,0	137	135,0	135,0	135,7
C1	-	22	22,0	13,0	19,0
T	0	558	555,0	562,0	558,3

Tabulka 2 Vypočtené hodnoty experimentu 1

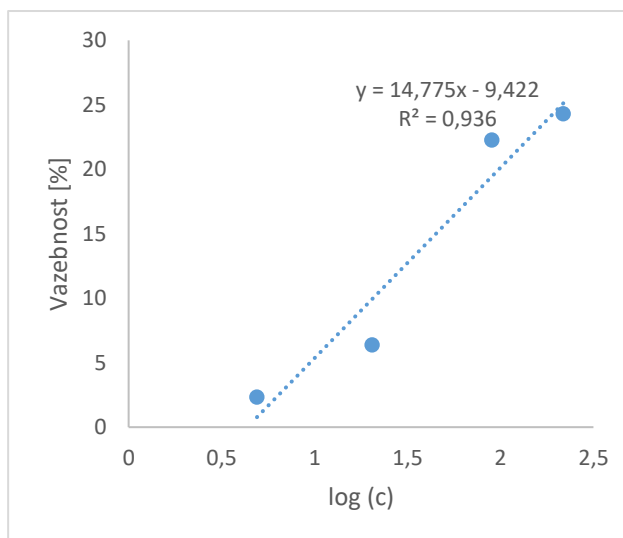
zkumavka	K2	K3	K4	K5
c [UI/ml]	4,9	20,4	90	218
Poměr	0,02	0,06	0,22	0,24
Vazebnost [B/T, %]	2,33	6,37	22,27	24,3

Výsledků jsme dosáhli v log-lin závislosti:

Výpočet koncentrace C1:

$$(y+9.422) / 14.775 = x$$

$$x = 7.244 \text{ UI/ml}$$



Graf 1 Závislost vazebnosti na logaritmu koncentrace

Druhá skupina

Tabulka 3 Naměřené aktivity experimentu 2 (cps – počet impulzů za sekundu)

	koncentrace [IU/ml]	1. měření [cps]	2. měření [cps]	3. měření [cps]	průměr [cps]
K1	0	2	1	0	1,00
K2	8,2	5	5	5	5,00
K3	27,4	10	10	11	10,33
K4	82	19	17	19	18,33
K5	274	84	84	85	84,33
K6	820	227	232	230	229,67
C1	-	12	13	12	12,33
T	0,0	755	766	758	759,67

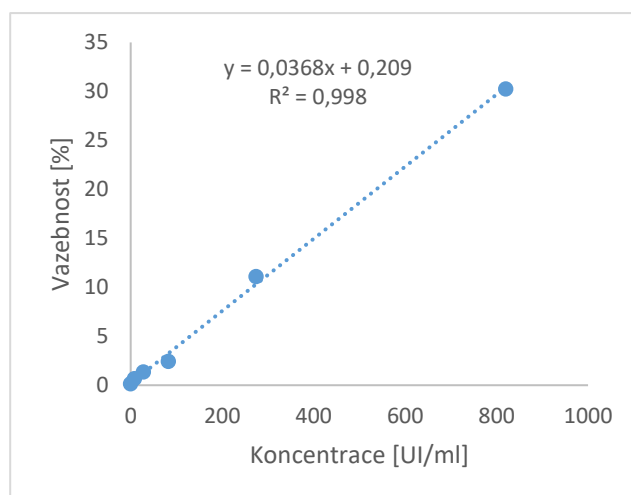
Tabulka 4 Vypočtené hodnoty experimentu 2

zkumavka	K1	K2	K3	K4	K5	K6
koncentrace [UI/ml]	0	8,2	27,4	82	274	820
poměr	0,00	0,01	0,04	0,11	0,36	1,08
vaznost	0,00	1,08	3,61	10,79	36,07	107,94

Výsledků jsme dosáhli výpočtem:

$$x = (y - 0.209)/0,0368$$

$$x = 38.44 \text{ UI/ml}$$



Graf 2 Závislost vazebnosti na koncentraci

5. Závěr

Při těchto experimentech se ukázalo, jak lze stanovit koncentraci AFP a hCG v neznámém vzorku. Výsledky byly získané z rovnice lineární regrese, která popisuje závislost procenta vazebnosti na logaritmu koncentrace v případě stanovení látky AFP a závislost procenta vazebnosti na koncentraci v případě stanovení hCG. Bylo zjištěno, že koncentrace neznámého vzorku AFP byla 7,22 UI/ml a koncentrace hCG byla 38,44 UI/ml.

Poděkování

Chtěli bychom vyjádřit svůj vděk Fakultě jaderného a fyzikálního inženýrství, katedře jaderné chemie a též vedoucímu práce Bc. Michalovi Sakmárovi, Ing. Ekaterině Kukleve a RNDr. Martinovi Vlkovi, Ph.D. za pomoc, cenné rady a připomínky.

Reference

- [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] CHAPMAN, R.S. *Immunoassays In Clinical Chemistry (Principles Of Immunoradiometric Assays)* [online]. London [cit. 2017-06-20]. Dostupné z: http://www.iaea.org/inis/collection/NCLCollectionStore/_Public/29/024/29024304.pdf