

Radioimunoanalýza

Vítězslav Havlíček¹, Karolína Nejedlá², Pavel Savin³

¹*Gymnázium Velké Meziříčí, vita.havlicek1@seznam.cz*

²*Gymnázium Nad Kavalírkou, kkajanejedla@gmail.com*

³*Gymnázium Omská, pavelsavin100@gmail.com*

Abstrakt:

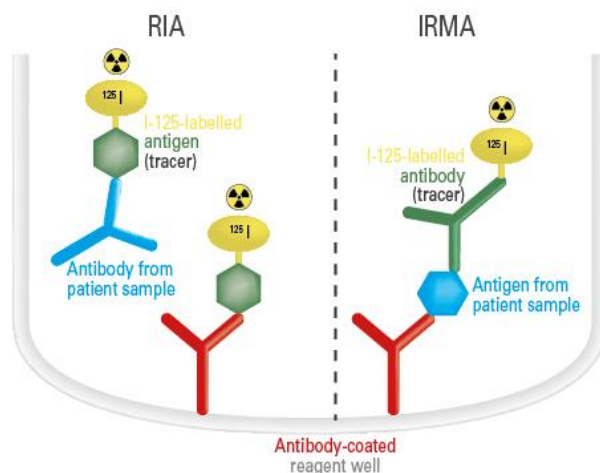
Prostřednictvím radioimunoanalýzy lze stanovit koncentraci různých hormonů a antigenů v krevním séru, mozkomíšním moku nebo moči. Tato práce se zabývá určením koncentrace prolaktinu v neznámém vzorku. Ke stanovení byla využita metoda IRMA, která je založena na využití značené a neznačené protilátky.

1 Úvod

Imunoradiometrické stanovení (IRMA) umožňuje stanovit koncentraci dané látky ve zjišťovaném vzorku. To poskytuje diagnostické prostředky ke zjištění fyziologických výchytek zejména v hormonální regulaci, které mohou doprovázet různě závažné patologické stavy. V následující práci jsme se zaměřili na stanovení koncentrace prolaktinu, hormonu stimujícího laktaci a vývoj mléčné žlázy. Intenzita jeho sekrece běžně vzrůstá při ovulaci, těhotenství, kojení či vystavení stresu.

Zvýšená hladina prolaktinu také provází některé chorobné stavy, mezi něž patří vytvoření hypofyzálního adenomu (produkujícího prolaktin), hypotyreózu či renální nedostatečnost. Naopak nedostatkem prolaktinu se projevuje poporodní Sheehanův syndrom, v některých případech adenektomie. Nejčastější diagnostické uplatnění má při určení reprodukčních problémů žen.

Analýza metodou IRMA je založena na použití dvou protilátek vůči stanovované látce X. První protilátka A je neznačená a je nehybně zakotvena na stěnách zkumavky, druhá protilátka je radioaktivně značená A*. Vzorek prochází dvěma hlavními fázemi. V první fázi je převeden do zkumavky a dochází k navázání stanovované látky na protilátku na stěně zkumavky. Ve druhé fázi dochází k přidání druhé protilátky nesoucí radionuklid, která je taktéž schopna vazby ke zkoumané látce. Díky tomu jsou všechny molekuly stanovované látky pevně navázány ke stěně nádoby a označené radionuklidem, a vzniká tzv. sandwich A-X-A*. Po odstranění přebytečného roztoku je možné změřit aktivitu vzorku. Platí přímá úměra: vyšší koncentrace stanovované látky povede k vyšší naměřené aktivitě vzorku.



Obr. 1: Schematické srovnání metod RIA a IRMA.¹

Druhou často využívanou metodou je radioimunoanalýza (RIA). Na rozdíl od IRMA je při ní využívána pouze jedna specifická protilátka A, a dále máme stanovovanou látku X a radioaktivně značenou látku X*. V roztoku vzniká specifický komplex A-X*. Následně je do směsi přidána stanovovaná látka X, která díky identické rovnovážné konstantě s označenou látkou X* nahradí část jejích molekul v komplexu, a vzniká komplex A-X. U RIA metody platí nepřímá úměra: vyšší koncentrace stanovované látky X povede k nižší naměřené aktivitě vzorku. Výhodou je nutnost pouze jedné specifické protilátky.

2 Materiály a pomůcky

- Prolactin IRMA kit (Beckman Coulter)
 - 11 zkumavek potažených monoklonální protilátkou proti prolaktinu
 - monoklonální protilátka proti prolaktinu, značená ¹²⁵I
 - kalibrátory: 5 lahviček s prolaktinem, lahvička nulového kalibrátoru
 - lahvička kontrolního vzorku
 - promývací roztok
- automatické pipety, parafilm, orbitální a horizontální třepačka, kapátka, studnový NaI(Tl) detektor, obvyklé laboratorní vybavení

3 Metodika

Do stojánku jsme umístili dvě zkumavky označené T₁ a T₂, šest zkumavek pro vytvoření kalibrační přímky (označeno 0-5) a tři zkumavky pro neznámý vzorek (C₁, C₂, C₃).

Dále jsme do zkumavek 0-5 napipetovali 50 μl příslušných standardů a do zkumavek C₁, C₂, C₃ 50 μl neznámého vzorku. Koncentrace analytu v jednotlivých zkumavkách je uvedena v Tab. 1.

Tab. 1: Koncentrace prolaktinu ve zkumavkách

zkumavka	T ₁	T ₂	0	1	2	3	4	5	C ₁	C ₂	C ₃
koncentrace prolaktinu [ng/ml]	0,0	0,0	0,0	1,8	9,7	43,7	87,5	175	?	?	?

Do všech zkumavek jsme napipetovali 500 µl radioindikátoru a uzavřeli parafilmem. Následně jsme zkumavky promíchali na vibrační míchačce a umístili na třepačku, kde jsme zkumavky nechali inkubovat jednu hodinu.

Po ukončení inkubace jsme kapátkem odsáli ze všech zkumavek (kromě T₁ a T₂) kapalinu.

Do stejných zkumavek jsme přidali zhruba 2 ml promývacího roztoku a jejich obsah následně opět odsáli. Promytí jsme opakovali ještě jednou.

Prostřednictvím studnového NaI(Tl) detektoru jsme změřili aktivitu zkumavek. Třikrát jsme změřili aktivitu pozadí a poté i aktivitu všech vzorků.

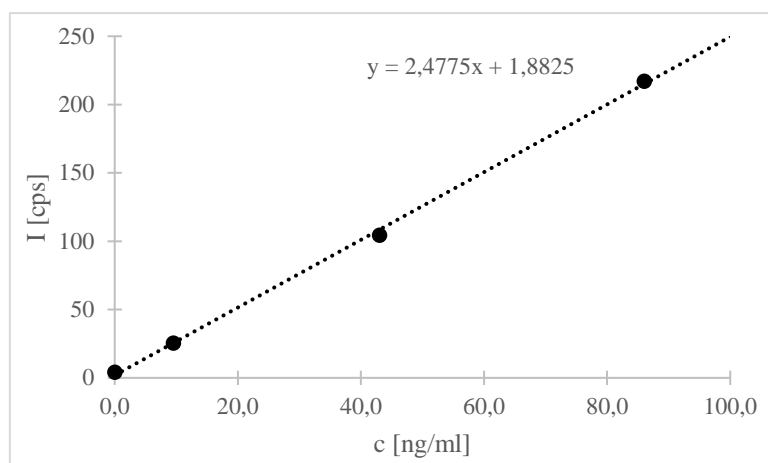
4 Výsledky a diskuse

V Tab. 2 jsou uvedeny hodnoty naměřených četností impulsů ze všech tří měření (I₁, I₂, I₃). I_p znázorňuje jejich průměrnou hodnotu. I je rozdíl I_p a průměrné hodnoty naměřených četností impulsů pozadí (52 cps).

Tab. 2: Naměřené a vypočítané hodnoty četnosti impulsů v jednotlivých zkumavkách.

zkumavka	I ₁ [cps]	I ₂ [cps]	I ₃ [cps]	I _p [cps]	I [cps]
0	56	57	54	56	4
1	88	87	85	87	35
2	79	76	76	77	25
3	157	155	156	156	104
4	264	271	271	269	217
5	391	388	396	392	340
C ₁	66	69	70	68	17
C ₂	68	72	67	69	17
C ₃	66	68	72	69	17
T ₁	1233	1229	1234	1232	1180
T ₂	1220	1227	1238	1228	1177

Z naměřených hodnot 0, 2, 3 a 4 jsme vypočetli kalibrační křivku (Graf 1), hodnoty 1 a 5 jsme vyřadili pro jejich odlehlost. Tuto křivku jsme použili k výpočtu koncentrace prolaktinu ve zkoumaném vzorku.



Graf 1: Znárodnění kalibrační křivky (závislost četnosti impulsů vzorku na koncentraci prolaktinu).

Po výpočet koncentrace ve zkoumaném vzorku jsme využili průměrnou hodnotu aktivit ($I = 17$) z C1–C3. Úpravou rovnice kalibrační přímky jsme získali následující vztah:

$$c = \frac{17 - 1,883}{2,478}$$

Koncentraci prolaktinu ve vzorku jsme stanovili na 6,1 ng/ml. Tato hodnota se blíží referenční koncentraci $4,79 \pm 1,2$ ng/ml.

5 Shrnutí

V rámci miniprojektu Radioimunoanalýza jsme se seznámili s radioimunologickými metodami. Metodou IRMA jsme určili koncentraci prolaktinu ve zkoumaném vzorku (6,1 ng/ml) pomocí naměřené četnosti impulsů ve vzorcích o známé koncentraci a sestavení kalibrační křivky. Námí provedené měření má relativně malou odchylku od referenční hodnoty, a proto jej můžeme považovat za vypovídající.

Poděkování

Chtěli bychom poděkovat organizačnímu týmu Týdne vědy na FJFI ČVUT za realizaci této akce a za možnost si vyzkoušet vědeckou práci. Velké díky patří také garantům našeho miniprojektu, Ing. Lukáši Ondrákovi a Ing. Marii Skálové, za trpělivost a cenné rady.

Reference

- [1] Euroimmun. *Radioimmunoassays* / EUROIMMUN AG [on-line]. c2022 [cit. 2022-06-21]. Dostupné z: <<https://www.euroimmun.com/products/techniques/radioimmunoassays/>>.
- [2] Návod k laboratorní úloze „Radioimunologické metody“.