

Radioimunoanalýza

A. Felcmanová*, T. Chuchmová**, T. Pravda***

*Gymnázium Na Zatlance, anicka.felcmanova@gmail.com

**Gymnázium V. Beneše Třebízského, terezachuchmova@seznam.cz

***Gymnázium, Ostrava-Hrabůvka, p.o., tomas.pravda@volny.cz

Abstrakt:

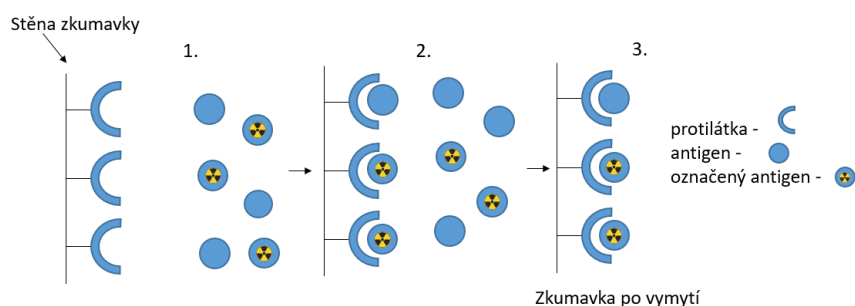
Radioimunoanalýza zahrnuje metody, které jsou využívány ke stanovení koncentrací různých biologicky významných molekul, proti kterým je organismus schopen tvořit protilátky.

Použili jsme metodu imunoradiometrického stanovení (IRMA) ke stanovení obsahu lidského choriogonadotropinu (hCG). Ve vzorku C1 byla stanovena koncentrace 33,7 IU/l a ve vzorku C2 byla stanovena koncentrace 187 IU/l.

1 Úvod

Radioimunoanalytické metody (angl. radioimmunoassay) byly vyvinuty během 50. let 20. století v USA jadernou fyzičkou R. S. Yalowovou a lékařem S. Bersonem za účelem stanovení koncentrace peptidového hormonu inzulinu [1]. Využívány jsou například izotopy ^{57}Co (stanovení vit. B12 – kobalaminu), ^{125}I (označení albuminu, stanovení objemu krve) a ^{51}Cr (označení erytrocytů, stanovení objemu krve a životnosti erytrocytů). [2]

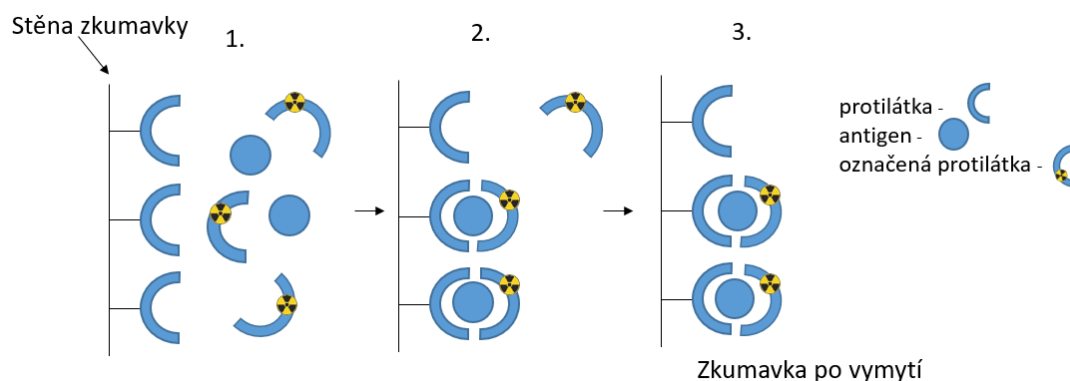
Je využíváno vazby protilátky (Ab – angl. antibody) a antigenu (Ag – angl. antigen), přičemž jedna z této dvojice je radioaktivně označena. Výhodou těchto metod je vysoká citlivost a specifita vazby Ab-Ag. Využívány jsou metody RIA (angl. radioimmunoassay) a IRMA (angl. immunoradiometric assay), přičemž v obou případech je radioaktivně neoznačená protilátka Ab navázána na stěně zkumavky dodané výrobcem.



Obrázek 1 RIA

· RIA – je použita jedna protilátka Ab a dva antigeny Ag a Ag*, z nichž Ag* je radioaktivně označen. Ag a Ag* spolu soutěží o vazebná místa na protilátce, kdy vztah mezi naměřenou

četností impulzů a koncentrací zjišťovaného antigenu Ag je nepřímě úměrný. Tato metoda se označuje jako kompetitivní.



Obrázek 2 IRMA

· IRMA – jsou použity 2 protilátky Ab a Ab*, z nichž je Ab* radioaktivně označena, a jeden antigen Ag, který se váže na protilátku Ab přítomnou na stěně zkumavky. Následně se na jiné místo Ag v rámci již vzniklého komplexu Ag-Ab naváže radioaktivně označená protilátka Ag*, čímž vzniká komplex Ab-Ag-Ab*. Tato metoda se označuje jako sendvičová.

V naší práci byla zjišťována koncentrace lidského choriového gonadotropinu (hCG), což je glykoprotein produkovaný zejména v těhotenství placentou. Stanovení jeho koncentrace v krvi nebo moči je podstatou některých těhotenských testů. hCG stimuluje tvorbu žlutého tělíska, zvýšená koncentrace v krvi matky v průběhu těhotenství může indikovat Downův syndrom plodu. Zvýšené hodnoty hCG v organismu jsou využívány jako marker některých typů nádorů. [3]

Během naší práce byla stanovena koncentrace hCG pomocí metody IRMA. Bylo využito izotopu ^{125}I , který se přeměňuje záchytem elektronu za emise fotonového záření. Má poločas rozpadu 59,4 dne.

2 Materiály

hCG IRMA KIT (Backman Coulter, Inc.), Automatická pipeta, Stojan na zkumavky, Pasteurova pipeta, Orbitální třepačka, Vortex, Parafilm, Scintilační studnový detektor NaI:TI.

3 Metodika

Do zkumavek, potažených protilátkou proti hCG bylo odměřeno 50 μl kalibrátoru, nebo vzorku. K nim bylo přidáno 200 μl radioindikátoru. Do dvou zkumavek byl přidán pouze radioindikátor a byly použity pro zjištění celkové aktivity. Následně byly zkumavky uzavřeny pomocí parafilmu a promíchány za použití vortexu. Po promíchání byly zkumavky na hodinu umístěny do orbitální třepačky při laboratorní teplotě. Poté byl obsah zkumavek odsán pomocí pasteurovy pipety, s výjimkou zkumavek pro zjištění celkové aktivity, kde byl radioindikátor ponechán. Následně byly všechny zkumavky promyty 2 ml promývacího roztoku. Poté byla 3x 60 sekund změřena četnost impulzů jednotlivých zkumavek za použití scintilačního

studnového detektoru NaI:Tl. Na závěr se získaná data zavedla do grafu, ze kterého bylo možno vypočítat koncentraci měřených vzorků.

4 Výsledky

Naměřené hodnoty jsou uvedeny v Tabulka 1. Druhý až čtvrtý sloupec odpovídá třem naměřeným hodnotám četnosti impulzů. Z těchto tří hodnot byl vypočten průměr, který je uveden v pátém sloupci. Kvůli hodnotě pozadí a nespecifické vazbě byla od každé průměrné hodnoty četnosti impulzů odečtena průměrná hodnota vzorku s nulovou koncentrací. Hodnoty koncentrací a četnosti impulzů byli zlogaritmovány a vyneseny do grafu (viz Obrázek 3) a proloženy přímkou, čímž byla získána rovnice:

$$\log (I_{\text{kal}} - I_0) = 0,99486 \cdot \log c - 0,851$$

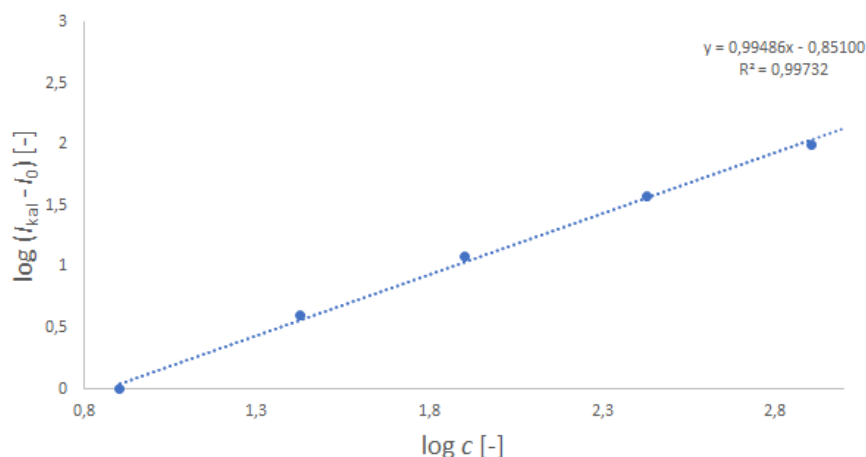
Následně byly dopočítány logaritmy koncentrací neznámých vzorků (C1 a C2) a odlogaritmováním byly získány koncentrace C1 a C2. Koncentrace prvního neznámého vzorku hGC (C1) byla stanovena na 33,7 IU/l a koncentrace druhého neznámého vzorku hGC (C2) byla stanovena na 187 IU/l.

Tabulka 1 Naměřené hodnoty

Vzorek hCG	1. měření I [cps]	2. měření I [cps]	3. měření I [cps]	Přůměrná hodnota I [cps]	$I-I_0$ [cps]	c [IU/l]	$\log (I_{\text{kal}}-I_0)$	$\log c$
0	3	2	3	2,7	0,0	0	-	-
1	3	4	4	3,7	1,0	8	0	0,90309
2	7	6	7	6,7	4,0	26,7	0,60206	1,426511
3	14	15	15	14,7	12,0	80	1,079181	1,90309
4	41	40	41	40,7	38,0	267	1,579784	2,426511
5	103	102	101	102,0	99,3	800	1,997095	2,90309
C1	8	7	7	7,3	4,7	?	0,669007	?
C2	28	29	28	28,3	25,7	?	1,409369	?
T1	388	384	390	387,3	384,7	0	2,585085	-
T2	385	383	385	384,3	381,7	0	2,581684	-

5 Diskuze

Pro vzorek C1 byla stanovena koncentrace 33,7 IU/l, přičemž výrobce uvádí koncentraci v rozmezí 24,7–41,1 IU/l, což je blízko střední hodnoty. Pro vzorek C2 byla stanovena koncentrace 187 IU/l, zatímco výrobce uvádí koncentraci v rozmezí 109–183 IU/l. Nepřesnost mohla vzniknout z několika důvodů například nepřesnou prací s pipetami, či neodsátí všeho roztoku ze zkumavek.



Obrázek 3 Kalibrační přímka

6 Shrnutí

Seznámili jsme se s metodou IRMA, pomocí níž jsme stanovovali koncentraci hCG ve dvou neznámých vzorcích. Změřili jsme množství impulzů emitovaných našimi vzorky. Hodnoty vzorků o známé koncentraci jsme vhodně upravili a vytvořili kalibrační křivku, díky které jsme postupnou úpravou získali hodnoty koncentrace neznámých vzorků. Ve vzorku C1 jsme naměřili koncentraci v rozmezí udávaném výrobcem, ve vzorku C2 jsme naměřili koncentraci mírně mimo rozmezí udávaného výrobcem.

Poděkování

Chtěli bychom poděkovat FJFI ČVUT a zejména našemu vedoucímu Bc. Matěji Štíbrovi za odborné vedení, cenné připomínky, kamarádský přístup, příjemnou pracovní atmosféru a chutné muffiny a čaj.

Reference:

- [1] O. Lapčík. *50 let radioimunoanalýzy*. Chemické Listy. 2009, 103, 847-869.
- [2] G. B. Saha. *Fundamentals of Nuclear Pharmacy*. Sixth Edition. New York, USA: Springer, 2010. ISBN 978 1 4419 5859.
- [3] *Prenatal screening: Clinical aspects* [online]. [cit. 2023-06-20]. Dostupné z: https://immunotech.cz/Media/Default/Page/Prenatal_screening_Clinical_aspects.pdf