

Imunoradiometrické stanovení

A. Šulcová¹

¹G Botičská; sulcova.betka@gmail.com

Paulína Pažitková; Katedra jaderné chemie, FJFI ČVUT

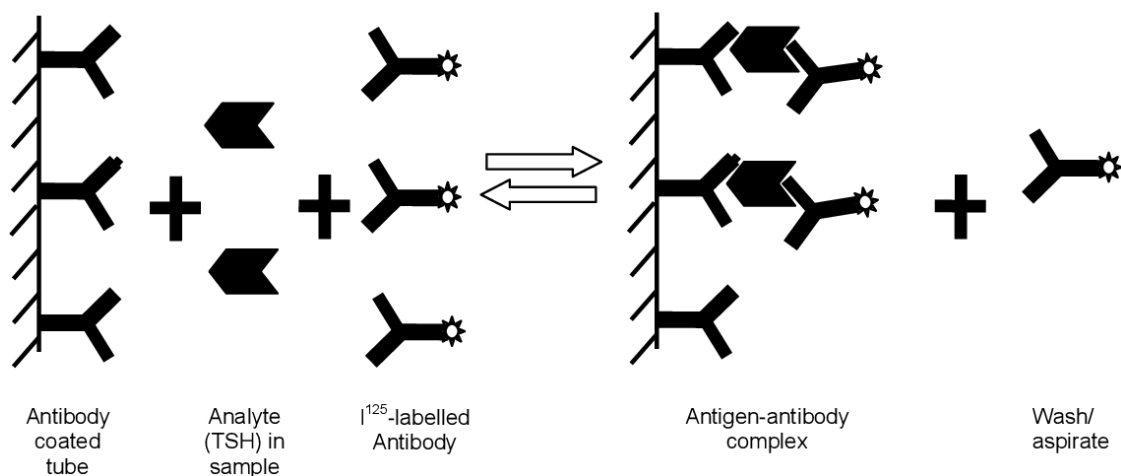
Abstrakt:

V rámci tohoto miniprojektu jsme stanovovali neznámou koncentraci prolaktinu metodou IRMA, která je založena na vazbě protilátka – antigen – protilátka značena ¹²⁵I. Tato metoda je velmi citlivá a umožňuje určit koncentraci látek v řádech nanogramů.

1 Úvod

Prolaktin (PRL) je hormon vylučovaný hypofýzou a v lidském těle stimuluje růst mléčné žlázy a laktaci. Nachází se v plazmě, mléčném séru, hlenu cervixu, mozkomíšním moku a spermatu a jeho sekrece se zvyšuje zejména při ovulaci, těhotenství či ve stresu. Zvýšená či nízká hladina prolaktinu se projevuje patologickými stavy, jako jsou například prolaktinomy (hypofyzální adenomy), hypotyreóza či Sheehanův syndrom.

V metodě IRMA se používají dvě protilátky, z nichž jedna (Y) je neoznačena a zafixována na stěnách zkumavky a druhá (Y*) je označena radioaktivním izotopem ¹²⁵I. Do zkumavky se přidá prolaktin X, který se naváže na antigen Y a následně se přidá i druhá, radioaktivně označená protilátka Y*. Během inkubace tak vznikne stabilní komplex Y-X-Y*. Platí také, že čím vyšší je koncentrace látky X, tím vyšší bude koncentrace navázaných radionuklidů Y*. Metoda se používá zejména při určování diagnózy reprodukčních problémů u žen.



Obrázek 1 Schématické znázornění metody IRMA²

2 Materiály a pomůcky

Prolactin IRMA kit (Immunotech Beckman)

- Zkumavky potažené protilátkou
- 5 lahviček se známou a jedna s nulovou koncentrací prolaktinu (0-5), dvě s neznámou koncentrací prolaktinu C1, C2
- Protilátka značená ^{125}I
- Promývací roztok

Poloautomatické pipety, parafilm, třepačka, studnový detektor NaI:TI

3 Metodika

Do stojánku bylo vloženo 7 zkumavek potažených protilátkou. Do šesti z nich bylo napipetováno 50 μl standardů prolaktinu o různých koncentracích a do zbylé byla napipetován prolaktin o neznámé koncentraci. Do všech zkumavek bylo poté napipetováno 500 μl protilátky s přítomným radionuklidem ^{125}I . Zkumavky byly uzavřeny parafilmem a hodinu inkubovány a míchány na třepačce. Po ukončení inkubace byla ze zkumavek odebrána kapalina a byly dvakrát promyty promývacím roztokem. Aktivita všech vzorků byla následně třikrát pro dobu 60 s měřena na studnovém detektoru. Byla stanovena kalibrační křivka, ze které se poté určila neznámá koncentrace prolaktinu. V Tabulce 1 jsou uvedeny hodnoty koncentrací standardů prolaktinu.

Tabulka 1 Koncentrace prolaktinu v jednotlivých zkumavkách

Zkumavka	0	1	2	3	4	5	C2
Koncentrace prolaktinu (c) [ng/ml]	0,0	1,9	10,2	46,0	92,0	184,0	?

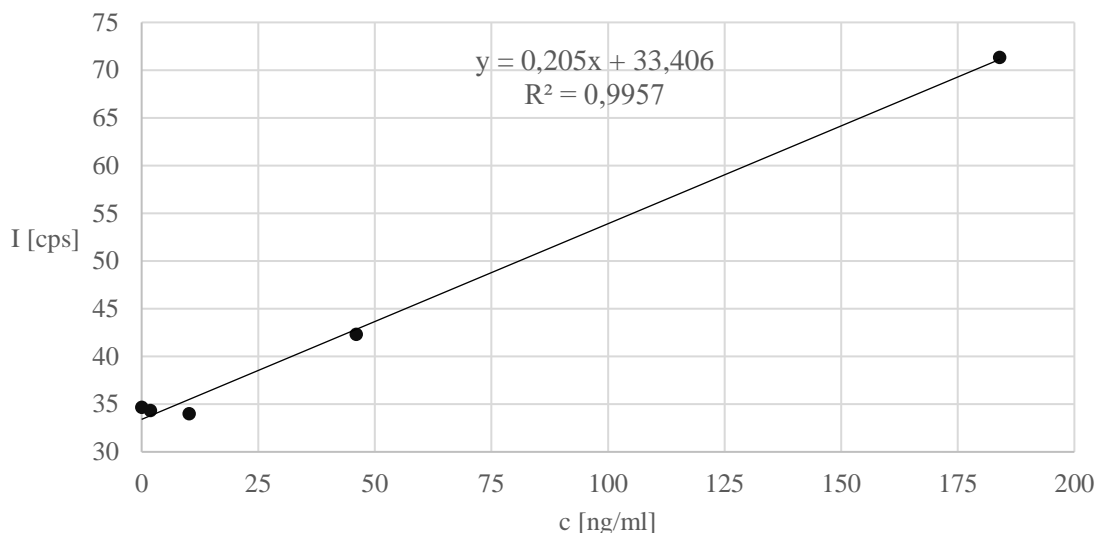
4 Výsledky a diskuse

V Tabulce 2 jsou uvedeny hodnoty četnosti impulsů za sekundu a jejich průměrná hodnota vzhledem ke koncentracím standardů prolaktinu.

Tabulka 2 Naměřené četnosti impulsů pro jednotlivé koncentrace

Zkumavka	Koncentrace prolaktinu (c) [ng/ml]	Četnost impulsů (I) [cps]			Průměrná četnost (I) [cps]
0	0	36	34	34	35
1	1,9	35	34	34	34
2	10,2	34	35	33	34
3	46	42	42	43	42
4	92	57	57	57	57
5	184	71	72	71	71
C2	?	42	45	43	43

Z naměřených hodnot v Tabulce 2 byla vytvořena kalibrační křivka závislosti průměrné hodnoty četnosti impulsů na koncentraci prolaktinu. Hodnota 57 cps náležící koncentraci standardu 92 ng/ml nebyla zahrnuta do kalibrační křivky, protože se odchylovala od jejího lineárního průběhu.



Graf 1 Kalibrační křivka průměrných hodnot četnosti impulsů v závislosti na koncentraci prolaktinu

Z lineárního přeložení dat jsme získali rovnici uvedenou v Grafu 1 a s její pomocí jsme následně vypočítali koncentraci prolaktinu v neznámém vzorku C2.

$$c = \frac{I_{C2} - 33,406}{0,205} = \frac{43 - 33,406}{0,205} = 46,8 \text{ ng/ml}$$

Referenční hodnota koncentrace neznámého vzorku C2 byla 33 ng/ml. Naše hodnota se od referenční hodnoty odlišuje nejspíš ze dvou důvodů. Prvním je stáří použitého kitu s přítomným radionuklidem, a tedy nízké hodnoty četnosti impulsů, které byly pro nižší koncentrace standardů shodné s četností impulsů pozadí. Proto kalibrační křivka nemusela být přesná. Druhým důvodem mohlo být nedostatečné promíchání a homogenizace vzorků před a během inkubace.

5 Shrnutí

V tomto miniprojektu jsme pomocí metody IRMA stanovili kalibrační křivku hodnot četnosti impulsů vzorků v závislosti na koncentraci standardů prolaktinu. Z rovnice křivky jsme vypočítali neznámou koncentraci prolaktinu ve vzorku C2 o hodnotě 46,8 ng/ml.

Poděkování

Děkuji své školitelce Bc. Paulíně Pažitkové za ochotu, cenné rady, konzultace a za pomoc s celým projektem. Děkuji také organizátorům Týdne vědy na Jaderce za příležitost si miniprojekt a vědeckou práci vyzkoušet.

Reference

- [1] Návod k laboratorní úloze Radioimunologické metody (RIA, IRMA) převzáné ze skript Studijní texty pro praktikum z radiačních metod v biologii a medicíně.
- [2] SAJID, K. M., 2020. COMPARATIVE ASSESSMENT OF QUALITY OF IMMUNORADIOMETRIC ASSAY (IRMA) AND CHEMILUMINESCENCE

IMMUNOMETRIC ASSAY (CHEIMA) FOR ESTIMATION OF THYROID
STIMULATING HORMONE (TSH). *The Nucleus*. 46(4), 487–494. ISSN 2306-6539.