

Radioimunoanalýza

D. Nguyen Tuan¹, H. Ho Trong¹, H. Ho Thi My¹, V. Peterková², M. Doležalová³, V. Lukačko⁴

¹Gymnázium Teplice, Teplice, Čs. Dobrovolců 11;
dasukinguyen@gmail.com, hanh1998@seznam.cz,
brigadaprodiva@seznam.cz

²Gymnázium a SOŠ Plasy, Plasy, Školní 281; peterkovav@email.cz

³Gymnázium Brno-Řečkovice, Brno, Terezy Novákové 2;
mamde@seznam.cz

⁴Gymnázium Varšavská, Žilina, Varšavská cesta 1;
v.lukacko1@gmail.com

Abstrakt:

V rámci našeho miniprojektu jsme pracovali s diagnostickou metodou, která se aplikuje v nemocnicích. Metoda využívá specifické vytváření vazeb mezi tyroxinem a jeho protilátkou. Ke stanovení vzniklého komplexu se využívá radioindikátor ¹²⁵I. Výsledkem práce je srovnání dvou různých metod určování koncentrace tyroxinu ve vzorku a posouzení vhodnosti využití v praxi.

1 Úvod

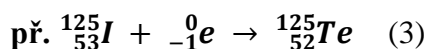
Radioimunoanalýza (RIA) je široce využívanou metodou pro stanovování látek o velmi nízkých koncentracích v tělních tekutinách. Vhodné jsou například krevní sérum, plazma, mozkomíšni mok či moč. Poprvé se v odborné literatuře (časopis Nature) o metodě zmiňují v listopadu roku 1959. Podrobnější popsání metody proběhlo o osm měsíců později v časopise Journal of Clinical Investigation. Článek obsahoval výsledky použití metody u 66 pacientů a 30 kontrolních vzorků. O rozvoj této metody se nejvíce zasloužili Rosalind Yalowová a Solomon Berson. [1]

RIA je dnes jednou z důležitých pomůcek při stanovení diagnózy např. rakoviny, onemocnění štítné žlázy. Prakticky můžeme stanovit každou látku, ke které známe protilátku. Protilátky jsou biomolekuly, u nichž v přítomnosti ionizujícího záření může docházet k destrukci či jejich modifikaci. Za nevýhodu může být považována změna imunoreaktivity značené protilátky.

Princip metody spočívá ve vytvoření specifické vazby mezi látkou a protilátkou. Reakční směs obsahuje stanovovanou látku (tyroxin, T), značenou protilátku (Y*) a bionitylovaný analog stanovované látky (ligand, L). Obě látky mají stejnou či podobnou schopnost se vázat s protilátkou a soutěžit o její vazbu, čímž vznikají komplexy T-Y* a L-Y*. Komplex L-Y* se naváže na stěnu zkumavky, která je potažená avidinem, a zbylý obsah zkumavky se odpipetuje. Čím více T je ve stanovovaném vzorku, tím méně vzniká komplexu L-Y*, a tedy celková aktivita vzorku je nižší. [2]

Nejčastěji se ke značení protilátek využívá radionuklidu ¹²⁵I, který se rozpadá elektronovým záchyt. „Elektronový záchyt je izobarický proces, při kterém se chemická

povaha prvku změní tak, že nastává posun v periodické tabulce do bezprostředně následující skupiny (doprava).“ [3] Tento proces lze popsat následujícími rovnicemi:



2 Stanovení volného tyroxinu

Materiál a přístroje

Byl použitý RIA set, který obsahoval protilátku proti tyroxinu ^{125}I (310 kBq k 8.5.2015), kalibrační roztoky volného tyroxinu o koncentracích 0 pM; 2,6 pM; 10,0 pM; 26,3 pM; 75,0 pM. Dále pak biotinylovaný analog tyroxinu (L) a vzorek o neznámé koncentraci.

Jako pomůcky byly použity zkumavky potažené avidinem, automatické pipety, kapátka, vibrační míchačka a stojánek na zkumavky. Aktivity jednotlivých vzorků byly měřeny na scintilačním detektoru CII CRC-55tW se studnovým krystalem (NaI(Tl)).

Metoda

Do jednotlivých zkumavek jsme postupně napipetovali 25 μl kalibračního roztoku o daných koncentracích včetně roztoku s koncentrací neznámou. Dále jsme přidali 400 μl radioindikátoru a 100 μl ligandu. Roztok jsme promíchali, následně jsme zkumavky uzavřeli parafilmem a umístili na vibrační míchačku, kde se po dobu 1 hodiny inkubovaly. Po ukončení inkubace jsme ze zkumavek odsáli kapalinu a na měřicí soupravě změřili hodnoty pozadí a aktivit jednotlivých zkumavek.

Zkumavky pro standardy jsme označili čísly od 0 do 4 podle rostoucí koncentrace protilátky, zkumavky s neznámou koncentrací jsme označili X. Hodnotu celkové radioaktivity přidávaného radioindikátoru jsme označili T, po inkubaci jsme žádný radioindikátor neodsávali.

Použili jsme dvě různé metody stanovení výsledku. Jejich srovnání je uvedeno v diskuzi.

Výsledky

Změřené aktivity jsou uvedeny v **Tab. 1** a **2**. Naměřené hodnoty aktivit a pozadí jsme zprůměrovali a následně odečetli průměr pozadí od průměru aktivit. Získané hodnoty jsou v **Tab. 1** a **2**

Tab. 1: Naměřené aktivity a vypočítané průměry experimentu 1

Zkumavka	0	1	2	3	4	X0	T
Aktivita 1 [imp/s]	238	200	175	84	53	132	491
Aktivita 2 [imp/s]	240	202	173	84	52	130	488
Aktivita 3 [imp/s]	241	203	171	84	52	133	490
Průměr	240	202	173	84	52	132	490
Průměr pozadí	17						
Rozdíl průměrů	223	185	156	67	35	115	473

Tab. 2: Naměřené aktivity a vypočítané průměry experimentu 2

Zkumavka	0.1	0.2	1	2	3	4	X1	X2
Aktivita 1 [imp/s]	237	243	181	151	74	40	146	128
Aktivita 2 [imp/s]	240	243	181	152	75	40	146	124
Aktivita 3 [imp/s]	242	243	182	152	76	42	145	122
Průměr	240	243	181	152	75	41	146	125
Průměr pozadí	16							
Rozdíl průměrů	224	227	165	136	59	25	130	109

Ze získaných průměrů aktivit a zadaných koncentrací jsme vypočítali vazebnost a logaritmus koncentrace na základě **rovnice 4 a 5**:

$$\text{vazebnost} = \frac{B}{T} \cdot 100\% \quad (4)$$

$$c \rightarrow \log(c) \quad (5)$$

kde B je průměr impulsů za sekundu vzorků a T je u experimentu 1 celková přidaná radioaktivita [imp/s] a u experimentu 2 aktivita standartu s nulovou koncentrací tyroxinu [imp/s] a c je koncentrace [pmol/l].

Vypočítané hodnoty jsou uvedeny v **Tab. 3 a 4**.

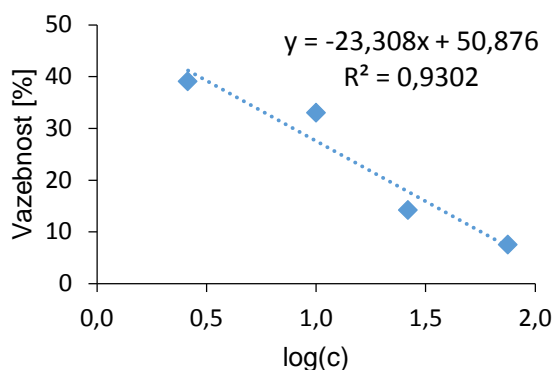
Tab. 3: Zpracované výsledky experimentu 1

Zkumavka	0	1	2	3	4	X0	T
Koncentrace [pmol/l]	0	2.6	10	26.3	75	?	-
Průměr aktivit [imp/s]	223	185	156	67	35	115	473
Vazebnost (B/T) [%]	47	39	33	14	7	24	100
log (c)		0.415	1.000	1.420	1.875		

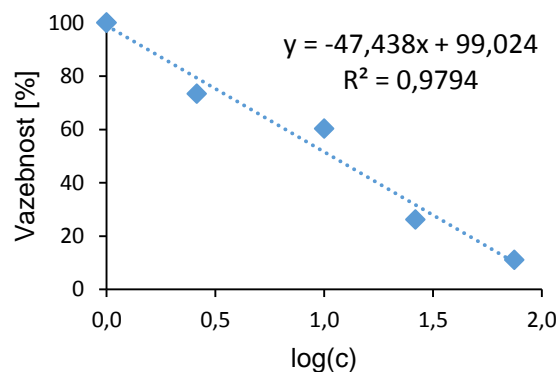
Tab. 4: Zpracované výsledky experimentu 2

Zkumavka	0.1	0.2	1	2	3	4	X1	X2
Koncentrace [pmol/l]	0	0	2.6	10	26.3	75	?	?
Průměr aktivit [imp/s]	224	227	165	136	59	25	130	109
Vazebnost (B/T) [%]	100	100	73	60	26	11	58	48
log (c)			0.415	1.000	1.420	1.875		

Pro grafické zpracování dat jsme použili koncentraci (c) v logaritmickém měřítku. Z uvedených hodnot pro vazebnost a logaritmu koncentrace jsme sestavili kalibrační **grafy 1 a 2** (uvedené na další straně).



Graf 1: Závislost vazebnosti komplexu L-Y* na koncentraci tyroxinu pro experiment 1



Graf 2: Závislost vazebnosti komplexu L-Y* na koncentraci tyroxinu pro experiment 2

Ze získaných závislostí vazebnosti na logaritmu koncentrace jsme dopočítali koncentrace tyroxinu v neznámých vzorcích podle rovnic uvedených v grafech (získali jsme hodnotu logaritmu koncentrace, kterou jsme převedli zpátky na koncentraci podle **rovnice 6**):

$$c = 10^a \quad (6)$$

kde c je koncentrace tyroxinu ve vzorku [pmol/l] a a je logaritmus koncentrace. Použité hodnoty a výsledky jsou uvedeny v **Tab. 5**.

Tab. 5: Stanovená koncentrace tyroxinu v neznámém vzorku

Zkumavka	X1	X2	X0
Vazebnost (B/T) [%]	58	48	24
log koncentrace	0.88	1.08	1.12
Tyroxin [pmol/l]	7.62	12.03	13.18

3 Shrnutí a diskuze

Stanovení koncentrace vzorku X1 není přesné, protože nám spadl do zkumavky typ z automatické pipety. Z tohoto důvodu jsme výsledek do následujících úvah nezahrnuli. Skutečná koncentrace stanoveného vzorku byla 15 ± 3 pmol/l [4].

V rámci výpočtů jsme použili dvě různé metody a posoudili jejich vhodnost pro využití v praxi. Výsledky obou metod určování koncentrace tyroxinu jsou srovnatelné. I přestože kytu vypršela doba expirace, výsledky jsou v rámci chyby.

Poděkování

Rádi bychom poděkovali FJFI za poskytnutí prostorů a techniky k práci na projektu. Dále bychom rádi poděkovali za pomoc a spolupráci vedoucím Ing. Petře Mičolové, Ing. Ekaterině Kukleva a Bc. Anně Bajzíkové.

Reference:

- [1] LABČÍK O.: *50 let Radioimunoanalýzy*, Chem. Listy 103, 2009, pp. 847–869
- [2] SMRČEK S.: *Návod k praktiku z radioimunoanalýzy*, PřF UK v Praze, 2015
- [3] MAJER V.: *Základy jaderné chemie*, Nakladatelství technické literatury ALFA, 1981, pp. 74-75
- [4] BECKMAN COULTER: *Návod k použití FT4 RIA KIT*, Immunotech s.r.o., 2014