



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

266 282

(21) Vy 2217-88.F
(22) Prihlášené 01 04 88

(40) Zverejnené 14 03 89
(45) Vydané 13 07 90

(11)

(13) B1

(51) Int. Cl.⁴
G 01 N 33/48

(75)

Autor vynálezu

GALOCI JĀN RNDr., MACHĀŇ VLADIMĪR ing. CSc., KOŠICE

(54)

**Spōsob rĀdioimunochemickĀho stanovenia antigĀnov s rōznou
štruktūrou**

(57) Spōsob rĀdioimunochemickĀho stanovenia je vhodnĀy na zistovanie veľmi nĀzkych koncentraciĀ antigĀnov s rōznou štruktūrou v krvnom sĀre, moĀi, mlieku, prĀpadne v extraktoch zo vzoriek tkanĀv alebo krmĀv. Podstatou je unifikovanĀ postup rĀdioimunochemickĀho stanovenia antigĀnov s rōznou štruktūrou, kĀe k roztoku špecifickej protilĀtky, jej antigĀnu znaĀenĀmu jōdom 125 a neznĀmej vzorke, resp. štandardu sa prĀdĀva kozia protilĀtka proti krĀlĀciemu imunoglobulĀnu imobilizovanĀ na modifikovanej mikrokryštalickej celuloze vĀdy v rovnakom množstve a na rovnakĀ dobu. Tento postup moĀno vyuĀiĀ na citlivĀ rĀdioimunochemickĀ stanovenie ľubovoľnĀho antigĀnu; separaĀnĀy systĀm sa vyznaĀuje veľmi dobrou stabilitou v roztoku, nĀzkou hodnotou nešpecifickej vĀzby ako aj nĀzkou sedimentaĀnou rĀchlostou pouĀitĀch ĀstĀcĀ.

Vynález sa týka spôsobu rádioimunochemického stanovenia antigénov s rôznou štruktúrou.

Rádioimunoanalýza (RIA) ako vysoko citlivá analytická metóda si od svojho zavedenia Yalovou a Bersonom v roku 1959 (Nature 184, 1 648 (1959)) našla široké uplatnenie pri analýze veľkého počtu zlúčenín.

Metóda RIA je založená na schopnosti protilátky a špecifického antigénu tvoriť reverzibilný komplex antiqén-protilátka. Dôležitou súčasťou celého rádioimunochemického stanovenia je spôsob separácie voľného a viazaného antigénu. K najčastejšie používaným metódam patrí zrážanie polyetylén glykolom, síranom amonným a inými organickými zlúčeninami, adsorpcia voľného antigénu na aktívnom uhlí, príp. využitie tzv. druhej protilátky (zvieracej protilátky proti králičiemu imunoglobulínu) v kombinácii s polyetylén glykolom. Nevýhodou poslednej z uvedených metód je zvyčajne pomerne zložitý postup optimalizácie separačného systému vždy iba pre jeden druh antigénu, nevyhnutnosť prídavku gamaglobulínu alebo normálneho králičieho séra do reakčnej zmesi a potreba chladených centrifúg. Precipitačná protilátka nie je stabilná v roztoku, preto ju výrobcovia RIA-súprav musia dodávať v lyofilizovanom stave a až samotný odberateľ si musí precipitačné činidlo pripravovať zmiešavaním niekoľkých substancií.

Vedľa uvedených separačných metód sa v poslednej dobe úspešne presadzuje aj metóda pevnej fázy, t. j. protilátok imobilizovaných na vhodnom type nosičov. Najvhodnejším spôsobom imobilizácie je kovalentná väzba protilátky na polymérny nosič (Santos, I., Waerenborgh, F., Patricio, L.: J. of Radional. Nucl. Chem. 102, 143 (1986)). V systémoch, kde je aplikovaný vhodný typ pevnej fázy, sa spravidla zjednodušuje a skracuje celková doba rádioimunochemického stanovenia.

Spôsobom podľa vynálezu sa zvieracia (s výhodou kozia) protilátka proti králičiemu imunoglobulínu imobilizuje na nosič, pripravený drvením mikrokryštalickej celulózy v keramickej nádobe s následnou homogenizáciou jej vodnej suspenzie v sklenenom homogenizátore a výberom najjemnejšej frakcie flotáciou; aktivovaný reakciou s 1,1'-karbonyldiimidazolom. Pri vlastnom rádioimunochemickom stanovení sa zvieracia protilátka proti králičiemu imunoglobulínu, imobilizovaná uvedeným spôsobom, pridáva vždy v rovnakom objeme a koncentrácii k roztoku, obsahujúcemu špecifickú protilátku, jej antigén značený jódom 125 a analyzovanú vzorku, resp. štandard. Vzhľadom k štruktúre použitého nosiča a metóde imobilizácie sa spôsobom podľa vynálezu dosiahne rovnováhy imunochemickej reakcie špecifická protilátka-nespecifická protilátka za 1 hodinu pri 20 °C bez ohľadu na to, či sa stanovuje antigén s nízkou alebo vysokou molekulovou hmotnosťou. Reakčnú zmes nie je potrebné počas inkubácie miešať ani trepať, pretože sedimentačná rýchlosť použitého nosiča je dostatočne nízka. Po ukončení jednohodinovej inkubácie sa nosič s imobilizovanou zvieracou protilátkou proti králičiemu imunoglobulínu, na ktorej je naviazaný komplex špecifická protilátka-antigén, odstredí zmeria sa rádioaktivita sedimentu a porovnaním s hodnotami získanými u štandardov so známymi koncentraciami antigénu sa stanoví obsah daného antigénu v neznámej vzorke.

Výhodou stanovenia antigénov s rôznou štruktúrou spôsobom podľa vynálezu je predovšetkým výrazná univerzálnosť metódy, možnosť skrátenia a zjedodúšenia celého postupu rádioimunochemického stanovenia, vysoký stupeň reprodukovateľnosti výsledkov, veľmi dobrá vizuálnosť sedimentu, čo zabraňuje jeho prípadnému odsatiu a tým získaniu nesprávnych výsledkov. K ďalším výhodám spôsobu podľa vynálezu patrí možnosť stanovenia antigénov s rôznou štruktúrou jednotným postupom za použitia spoločného precipitačného činidla, ktoré je priamo pripravené k použitiu a vyznačuje sa veľmi dobrou stabilitou aj v roztoku - pri 4 °C si nezmenené väzobné vlastnosti uchováva po dobu minimálne 4 mesiacov, čo má z technologického hľadiska veľký význam, lebo sa takto eliminuje fáza lyofilizácie. Pri vlastnom RIA-stanovení nie je potrebné do reakčnej zmesi pridávať gamaglobulín, normálne králičie sérum alebo polyetylén glykol, čo umožňuje zredukovať počet pipetovacích krokov. Na oddelenie voľnej a viazanej frakcie postačuje krátka centrifugácia v nechladienej centrifuge.

Stanovenie antigénov s rôznou štruktúrou spôsobom podľa vynálezu vďaka svojej univerzálnosti v konečnom dôsledku výrazne šetrí pracovné kapacity, znižuje technickú a materiálovú náročnosť optimalizácie tak separačného systému, ako aj celého rádioimunochemického stanovenia.

V nábehu je dokumentovaný príkladmi bez toho, aby sa nimi obmedzoval:

Pr í k l a d 1

Rádioimunoanalýza tyrotropného hormónu (TSH)

Hosič na imobilizáciu zvieracej protilátky proti králičiemu imunoglobulínu sa pripraví drcením mikrokryštalickej celulózy za sucha v keramickej nádobe. Celulóza sa potom suspenduje v destilovanej vode a homogenizuje v sklenenom homogenizátore. Frakcia s veľkosťou častíc 5 až 15 μm , získaná flotáciou, sa potom oddelí a vysuší za mierne zvýšenej teploty. K 5 hmotnostným dielom takto upravenej mikrokryštalickej celulózy sa pridajú 4 hmotnostné diely 1,1'-kaubonyldiimidazolu v 40 objemových dieloch acetónu. Aktivácia prebieha 2 h pri teplote 20 °C. Po premytí acetónom a 0,05 M fosfátovým tlmivým roztokom pH 7,5 sa aktivovaná mikrokryštalickej celulóza suspenduje v 40 objemových dieloch fosfátového tlmivého roztoku pH 7,5 a ihneď sa pridá 5 objemových dielov zvieracej (kozej) protilátky proti králičiemu imunoglobulínu. Imobilizácia prebieha za tmy po dobu 24 hodín. Imobilizovaná protilátka sa potom premyje fosfátovým tlmivým roztokom a nariedi v pomere 1:10. Takto pripravené precipitačné činidlo je priamo pripravené k použitiu.

K 200 μl špecifickej protilátky proti TSH sa pridá 200 μl štandardu, resp. neznámej vzorky krvného séra. Po predinkubácii 3 dni pri teplote 20 °C sa do reakčnej zmesi pridá 100 μl TSH značeného jódom 125. Zmes sa nechá stáť 24 h pri teplote 20 °C. Potom nasleduje prídanie precipitačného činidla po 500 μl na skúmavku a inkubácia 1 hodinu pri 20 °C. Po krátkej centrifugácii (5 až 10 minút pri 2 000 ot./min.) sa supernatant odstráni a zmeria sa rádioaktivita sedimentu. TSH možno takto stanoviť v koncentračnom rozsahu 0,6 až 40 mIU/l s dostatočnou citlivosťou (0,15 mIU/l) a nízkym variačným koeficientom (do 5,5 %) a nešpecifickou väzbou (do 2,7 %).

Pr í k l a d 2

Rádioimunoanalýza alfafetoproteínu (AFP)

100 μl špecifickej protilátky proti AFP, 100 μl tlmivého roztoku pH 7,5, 100 μl 125 I-AFP a 100 μl štandardu (vzorky) sa nechá inkubovať 18 hodín pri teplote 20 °C. K reakčnej zmesi sa potom pridá 500 μl suspenzie imobilizovanej zvieracej protilátky proti králičiemu imunoglobulínu, pripravenej postupom uvedeným v príklade 1. Po premiešaní a inkubácii 1 hodinu pri teplote 20 °C nasleduje krátka centrifugácia, odsatie supernatantu a meranie rádioaktivity sedimentu.

Týmto postupom možno stanoviť hodnoty AFP vo vzorkách krvného séra v rozsahu 6,25 až 400 IU/ml s vysokou citlivosťou stanovenia (2 IU/ml) a veľmi nízkou hodnotou nešpecifickej väzby (do 2,5 %).

Pr í k l a d 3

Rádioimunoanalýza tyroglobulínu (Tg)

K 200 μl štandardu (neznámej vzorky séra) sa pridá 100 μl špecifickej protilátky proti tyroglobulínu. Po predinkubácii 3 h pri 37 °C sa do reakčnej zmesi pridá 100 μl Tg značeného jódom 125 a zmes sa nechá stáť cez noc pri 20 °C. Potom sa do každej skúmavky pridá 500 μl precipitačného činidla, pripraveného postupom uvedeným v príklade 1. Po inkubácii

1 h pri 20 °C a krátkej centrifugácii sa supernatant odsaje a zmeria sa rádioaktivita sedimentu.

Uvedeným postupom možno stanoviť hodnoty tyroglobulínu v krvnom sére v rozsahu 7,5 až 500 µg/l s citlivosťou stanovenia 5 µg/l.

P r í k l a d 4

Rádioimunoanalytické stanovenie aflatoxínov v mlieku

Do skúmaviek sa pipetuje po 100 µl štandardu (múľového mlieka alebo neznámej vzorky), špecifickej protilátky proti aflatoxínu B₁ a rádioindikátora (¹²⁵I - AFLA B₁). Zmes sa zamieša a inkubuje cez noc pri 20 °C. Do skúmaviek sa potom pridá po 500 µl precipitačného činidla, pripraveného postupom uvedeným v príklade 1 /s obsahom 1 % TWEENU 80). Reakčná zmes sa nechá inkubovať 1 h pri 20 °C, skúmavky sa potom centrifugujú 10 minút pri 2 000 g, supernatant sa odsaje a zmeria sa rádioaktivita sedimentu.

Týmto postupom možno stanoviť hodnoty aflatoxínov v mlieku v rozsahu 0,062 5 až 2,0 µg/l s citlivosťou stanovenia 0,05 µg/l a variačným koeficientom do 5,9 %, s nešpecifickou väzbou do 5,5 %.

P r í k l a d 5

Rádioimunoanalýza ochratoxínu A

Ku 100 µl chloroformového extraktu zo vzorky krmiva, potraviny alebo tkaniva sa pridá 100 µl roztoku rádioindikátora (¹²⁵I-ochratoxín) a 100 µl špecifickej protilátky proti ochratoxínu A. Zmes sa inkubuje 1 hodinu pri 45 °C. Do každej skúmavky sa potom pridá po 500 µl precipitačného činidla a ďalším postupom, rovnakým ako v predchádzajúcich príkladoch, možno stanoviť hodnoty ochratoxínu A v extraktoch z rastlinných alebo živočíšnych vzoriek v rozsahu 10 až 320 mg/100 µl s citlivosťou stanovenia 8 mg/100 µl a variačným koeficientom do 5,7 %.

P R E D M E T V Y N Á J E Z U

1. Spôsob rádioimunochemického stanovenia antigénov s rôznou štruktúrou vyznačujúci sa tým, že ku špecifickej protilátke, inkubovanej vhodnú dobu s roztokom jej antigénu značenému jódom 125 a neznámou vzorkou príp. štandardom, sa pridáva suspenzia imobilizovanej zvieracej (s výhodou kozej) protilátky proti králičiemu imunoglobulínu vždy v rovnakej koncentrácii a objeme bez ohľadu na stanovovaný druh antigénu, pričom po inkubácii 1 h pri 20 °C sa vzniknutý imunochemický komplex odstreď, zmeria sa jeho rádioaktivita, pomocou ktorej možno porovnaním s hodnotami štandardov o známej koncentrácii stanoviť množstvo daného antigénu v neznámej vzorke.

2. Spôsob podľa bodu 1, vyznačujúci sa tým, že zvieracia protilátka proti králičiemu imunoglobulínu sa imobilizuje na povrchu modifikovanej mikrokryštalickej celulózy s veľkosťou častíc 5 až 15 µm majúcich veľmi nízku sedimentačnú rýchlosť, aktivovanej 1,1'-karbonyldiimidazolom.