

POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA



URZĄD
PATENTOWY
PRL

O P I S P A T E N T O W Y

91 092

Patent dodatkowy
do patentu nr _____

Zgłoszono: 21.09.73 (P. 165353)

Pierwszeństwo: _____

Zgłoszenie ogłoszono: 02.05.75

Opis patentowy opublikowano: 15.10.1977

MKP
G01n 33/16

Int. Cl.²
G01N 33/16

CYTEL NIA

Urząd Patentowy
Polskiej Rzeczypospolitej Ludowej

Twórcy wynalazku: Bronisława Grodecka, Małgorzata Landman, Kazimierz Zakrzewski

Uprawniony z patentu: Centralne Laboratorium Surowic i Szczepionek,
Warszawa (Polska)

Sposób radioimmunologicznego oznaczania substancji biologicznych, zwłaszcza hormonów, w płynach ustrojowych

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób radioimmunologicznego oznaczania substancji biologicznych, zwłaszcza hormonów, w płynach ustrojowych, przy użyciu swoistych przeciwciał, kowalencyjnie związanych z nierozpuszczalnym nośnikiem.

Metody radioimmunologiczne, oparte na ilościowym wiązaniu hormonu ze swoistym dla niego przeciwciałem, pozwalają na oznaczanie nanogramowych ilości hormonów w sółnicach, ekstraktach tkankowych i płynach ustrojowych. W chwili obecnej metody te ze względu na wysoką czułość i swoistość stanowią jedyną możliwość dokładnego oznaczania hormonów we krwi ludzkiej i są szeroko stosowane w laboratoriach klinicznych i naukowo-badawczych. Powstało więc zapotrzebowanie na kompletny, wystandaryzowany zestaw odczynników, pozwalających na rutynowe wykonywanie analiz.

Dotychczasowe sposoby przeprowadzania radioimmunologicznych oznaczeń hormonów w płynach ustrojowych, wykonywane za pomocą metody podwójnych przeciwciał lub tzw. fazy stałej, wykazują dużo wad analitycznych.

Metoda podwójnych przeciwciał, polegająca na wytrąceniu kompleksu hormonu ze swoistym dla niego przeciwciałem za pomocą drugiego przeciwciała, skierowanego przeciwko przeciwciału, związanemu w kompleks, wymaga użycia trzech różnych surowic, jest pracochłonna w wykonaniu i daje wynik dopiero po 3 – 5 dniach. Wynik ten uzależniony jest od stałych dysocjacji dwu różnych kompleksów, znajdujących się w roztworze, przez co obciążony jest dodatkowym błędem.

W metodach fazy stałej do oddzielenia kompleksu od

2

hormonu wolnego zamiast drugiego przeciwciała używane są nierozpuszczalne sorbenty takie, jak talk, węgiel aktywowany lub próbówki, ewentualnie krążki z tworzyw sztucznych. Są to jednak metody oparte na nieswoistych właściwościach sorbencyjnych tych nośników, wobec czego pozbawione są podstaw teoretycznych i nie zapewniają należytej powtarzalności wyników. Dla podniesienia swoistości metod fazy stałej próbowano stosować przeciwciała, kowalencyjnie związane z nierozpuszczalnym rozdrobnionym nośnikiem. Jednakże stosowane do tego celu nośniki takie, jak proszek celulozowy czy hydrofilne żele (agar i jego pochodne), nie spełniają zadowalająco swojego zadania ze względu na zbyt rozwiniętą powierzchnię i efekt sita molekularnego. Dodatkową trudność w wykonaniu analizy sprawia sposób równomiernego rozdawkowania bardzo małych ilości nośnika.

Sposób według wynalazku pozbawiony jest wad dotychczas stosowanych metod i polega na reakcji pomiędzy przeciwciałem, immobilizowanym na krążku bibuły, a hormonem, znajdującym się w roztworze. Kowalencyjne przywiązanie przeciwciała do bibuły zostało osiągnięte przez aktywację grup -OH w celulozie za pomocą prostej reakcji np. bromocjanowania. Fakt, że przeciwciała zostały związane z krążkami bibuły, a nie rozdrobnionym nośnikiem w zasadniczy sposób upraszcza metodykę postępowania. Krążki bibuły z przyłączoną ściśle określoną ilością przeciwciał umieszcza się w roztworach, zawierających śladową ilość hormonu znakowanego i próby badane, względnie wzorcowe roztwory hormonów, służące do sporządzenia krzywej kalibracyjnej. Po 15–20 godzinnej inkuba-

bacji w temperaturze pokojowej, krążki płucze się wodą i oznacza ich radioaktywność. Ilość związanego przez krążki hormonu znakowanego maleje wraz ze wzrostem stężenia hormonu nieznakowanego w mieszaninie inkubacyjnej. Pozwala to z prostolinijnego odcinka krzywej kalibracyjnej odczytać ilość hormonu, zawartego w próbce badanej.

Test wykonuje się w sposób bardzo prosty, przy czym pomijane są kłopotliwe zabiegi oddzielania i płukania śladowych ilości osadów za pomocą kilkakrotnego wirowania w ochłodzonych wirówkach, bądź też ich sączenia przez sączki membranowe.

Warunki analityczne wielu dotychczas stosowanych metod pozwalały na pomiar hormonów w surowicach dopiero po 2–3krotnym ich rozcieńczeniu. Sprawa uwzględniania, bądź nieuwzględniania tego wstępnego rozcieńczenia surowic, jest źródłem wielu kontrowersji i utrudnia porównywanie wyników, uzyskiwanych przez różne laboratoria. Sposób według wynalazku pozwala wykonywać pomiar w surowicach nierozcieńczonych, a więc prowadzi do oznaczenia rzeczywistej zawartości hormonu w próbce.

Przykład: Do 3000 krążków, wyciętych z bibuły filtracyjnej, o średnicy 0,5 cm, zawieszonych w 600 ml wody dodano 600 ml 4% wodnego roztworu CNBr. Reakcję bromocjanowania prowadzono przez 20 minut w pH = 10,5 – 11,0, utrzymywanym przez automatyczne dawkowanie 2N NaOH, przy łagodnym mieszaniu. Następnie krążki przepłukano na lejku ochłodzoną wodą i 0,1 M buforem węglanowym o pH = 8,5. Natychmiast po odmyciu krążki umieszczono w 450 ml buforu węglanowego, zawierającego 300 µg gammaglobuliny przeciwko ludzkiemu hormonowi wzrostu (tj. 0,5 µg/cm²) i łagodnie mieszano przez noc w temperaturze 4°C. Następnie krążki po przemyciu 0,5M NaHCO₃, wodą, 0,1M buforem octanowym o pH = 4,0, wodą i 0,5 M roztworem glicyny przechowywano w buforze fosforanowym o pH = 7,4, zawierającym 0,05% azydku sodu w temperaturze 4°C. Przydatność tak przygotowanych krążków do oznaczeń radioimmunologicznych sprawdzono w sposób następujący. Do szeregu probówek dano po 10 µl (0,5 ng) hormonu wzrostu, znakowanego

jodem radioaktywnym. Następnie do części probówek dodano po 0,5 ml kalibrujących roztworów, zawierających od 0,0625 do 16 ng hormonu wzrostu, a do pozostałych po 0,1 ml badanych surowic i 0,4 ml buforu weronalowego, zawierającego 0,2% albuminy wołowej. Bufor ten był używany do rozcieńczania wszystkich pozostałych roztworów. Wyniki obliczano w stosunku do próbek odniesienia, zawierających tylko hormon znakowany i 0,5 ml buforu weronalowego. W każdej z probówek umieszczano krążek bibuły i poddawano je wytrząsaniu przez 15–20 godzin. w temperaturze pokojowej, po czym krążki opłukiwano wodą i liczono ich radioaktywność. Ilość impulsów, znaleziona na krążkach, zmniejszała się wraz ze wzrostem stężenia hormonu nieznakowanego w mieszaninie inkubacyjnej. Zakres stężeń hormonu nieznakowanego, w którym zachowana była prostoliniowość krzywej kalibracyjnej wynosił od 0,0625 do 8,0 ng, co pozwalało oznaczyć od 0,6 do 80 ng hormonu wzrostu w 1 ml surowicy, gdyż do analizy brano po 0,1 ml surowicy. Zakres ten może być jednak regulowany ilością przyłączonych do krążka bibuły przeciwciał, co w zależności od potrzeb umożliwia oznaczanie zarówno małych, jak i dużych ilości hormonu. Analiza wielu różnych surowic wykazała, że ilość oznaczanego w nich hormonu wzrostu proporcjonalnie malała wraz z rozcieńczaniem surowicy.

Opisana metoda daje możliwość wprowadzenia na rynek znacznie tańszych i dogodniejszych w użyciu zestawów, niż dotychczas dostępnych zestawów podwójnych przeciwciał do radioimmunologicznych oznaczeń hormonów.

Zastrzeżenie patentowe

Sposób radioimmunologicznego oznaczania substancji biologicznych, zwłaszcza hormonów, w płynach ustrojowych przy użyciu swoistych przeciwciał, kowalencyjnie związanych z nierozpuszczalnym nośnikiem, **znamienny tym**, że swoiste przeciwciała przyłącza się kowalencyjnie do bibuły, uprzednio zaktywowanej, korzystnie bromocyanem.