



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

258362

(11) (B1)

(51) Int. Cl.⁴

G 01 N 33/487

(22) Přihlášeno 11 11 85

(21) PV 8100-85

(40) Zveřejněno 17 12 87

(45) Vydáno 14 04 89

(75)
Autor vynálezu

ŠIMÍČKOVÁ MARTA RNDr., LANG BOHUMÍR MUDr. CSc., BRNO,
SEMOTÁN KAREL RNDr., IVANOVIC, KOČENT ALEXANDR RNDr. CSc., BRNO

(54) Způsob kvantitativního stanovení alfa-laktalbuminu v tělních tekutinách
a vodných roztocích

Účelem řešení je kvantitativní stanovení alfa-laktalbuminu v tělních tekutinách nebo vodných roztocích v koncentračním rozsahu 0 až 200 µg/l. Dosahuje se ho tím, že alfa-laktalbumin obsažený v tělní tekutině nebo ve vodné roztoku se uvede do kontaktu s protilátkou proti alfa-laktalbuminu, sorbovanou na pevný nosič, z něhož byl nadbytek nenaborbované protilátky odstraněn vymýváním. Na vytvořený imunokomplex je po opakovaném promytí pevného nosiče navázána protilátka proti alfa-laktalbuminu značená enzymem. Po odstranění jejího nezreagovaného podílu se stanoví koncentrace enzymu, která je přímo úměrná koncentraci alfa-laktalbuminu. Řešení je využíváno v oboru klinické biochemie pro stanovení koncentrace alfa-laktalbuminu v séru nebo jiných tělních tekutinách, především u onkologických nemocných.

Vynález se týká způsobu kvantitativního stanovení alfa-laktalbuminu v tělních tekutinách a ve vodných roztocích.

Účelem vynálezu je stanovit alfa-laktalbumin v koncentracích, které se vyskytují v lidském séru, eventuálně v jiných tělních tekutinách (mléko, cystická tekutina prsu) nebo extraktech tkání. Stanovení této bílkoviny specificky syntetizované v mléčné žláze se uplatňuje především při studiu procesu vývoje rakoviny mléčné žlázy.

Je známý způsob kvantitativního stanovení alfa-laktalbuminu v tělních tekutinách metodou radioimunostanovení (K. L. Woods, D. H. Cove, J. M. Morrison, D. A. Heath: Eur. J. Cancer 15 (1979) 47-51). Nevýhodou tohoto způsobu je kompetitivní princip stanovení, kdy interferující složky ze vzorku (séra) je třeba předem odstranit vysrážením. Další nevýhodou je omezení této metody pouze na laboratoře se speciálním a nákladným přístrojovým vybavením, neméně závažné je i možné riziko kontaminace radionuklidy.

Výše uvedené nedostatky řeší metoda kvantitativního stanovení alfa-laktalbuminu v tělních tekutinách a vodných roztocích podle vynálezu, jejíž podstata spočívá v tom, že tělní tekutiny nebo vodný roztok obsahující alfa-laktalbumin se uvede do kontaktu s protilátkou proti alfa-laktalbuminu sorbovanou z roztoku o koncentraci 0,1 až 20 mg/l při teplotě 4 až 40 °C po dobu 1 až 72 hodin na pevný nosič, s výhodou na stěny jamek polystyrenové destičky, zbavené opakovaným vymýváním nenasorbované protilátky proti alfa-laktalbuminu a nechá se reagovat za teploty 20 až 40 °C po dobu 1 až 5 hodin za vzniku imunokomplexu, načež po opětném opakovaném promývání pevného nosiče se sorbovaný imunokomplex nechá reagovat s vodným roztokem protilátky proti alfa-laktalbuminu značené enzymem, o koncentraci bílkoviny 0,1 až 20 mg/l, a to po dobu 1 až 5 hodin při 20 až 40 °C a po odstranění jejího nezreagovaného podílu se stanoví koncentrace enzymu, která je přímo úměrná koncentraci alfa-laktalbuminu.

Výhodou uvedeného způsobu podle vynálezu je především odstranění rizika ozáření a kontaminace radionuklidy. Metodu lze provádět v běžně vybavených biochemických laboratořích. Nekompetitivní způsob stanovení eliminuje nutnost složitých kroků k odstranění interference látek ze vzorku.

Citlivost a reprodukovatelnost metody je srovnatelná s metodou radioimunostanovení. Přesnost v sérii a v čase odpovídá požadavkům klinické použitelnosti metody, to je v sérii 8 %, v čase 15 až 20 %. Správnost byla testována na širokém souboru pozitivních a negativních kontrolních sér, stanovením vnitřního přídávku a ředěním vzorků o vyšší koncentraci alfa-laktalbuminu. Způsob je jednoduchý, analýza se provádí v jedné zkumavce nebo jamce mikrotitrační destičky bez složitých operací a to v průběhu jednoho dne v sériích 50 i více vzorků.

Dále jsou uvedeny příklady možného způsobu stanovení lidského alfa-laktalbuminu ve vzorku.

P ř í k l a d 1

Příprava alfa-laktalbuminu: 1,5 g syrovátkových bílkovin, což je podíl lidského mléka získaný po precipitaci kaseinů při pH 4,6 za teploty 25 °C, je frakcionován na sloupci Sephadexu G-150 (5 x 80 cm) v pufru 0,02 mol/l tris-(hydroxymetyl)-aminometan s kyselinou chlorovodíkovou, pH 7,4 s 0,1 mol/l chloridem draselným. Polyakrylamidovou elektroforézou s dodecylsulfátem sodným (koncentrace akrylamidu 100 g/l) jsou identifikovány frakce bohaté na alfa-laktalbumin (molekulová hmotnost přibližně 14 000), ty jsou dále rechromatografovány na DEAE -Sephadexu A-50: 200 mg bílkoviny se eluuje ze sloupce 2,5 x 40 cm lineárním gradientem chloridu sodného (0,13 až 0,39 mol/l) v 0,02 mol/l fosfátovém pufru o pH 7,4.

Dominantní frakce vytékající při koncentraci 0,3 mol/l chloridu sodného je dialyzována, lyofilizována a užita pro přípravu protilátky.

Příprava protilátky proti alfa-laktalbuminu: provádí se imunizací kozy podle metody chráněné autorským osvědčením č. 209 966. Podstata metody spočívá v tom, že alfa-laktalbumin se emulguje dvousložkovým adjuvans, které obsahuje suspenzi hydroxidu hlinitého ve vodě a parafinový olej a vzniklá emulze se aplikuje narkotizovaným kozám intradermálně a opakovaně ve třítydenních intervalech vždy na více, například 50 míst.

Deset až dvacet dnů po poslední imunizaci se odebere krev imunizovaného zvířete a ze séra je izolována specifická protilátka afinitní chromatografií na alfa-laktalbumin-Sepharose. Alfa-laktalbumin-Sepharosa je připravena navázáním izolovaného alfa-laktalbuminu (90 mg) na CNBr-aktivovanou Sepharosu (15 g) v pufru 0,15 mol/l kyselý uhličitán sodný s 0,5 mol/l chloridem sodným o pH 8,3. Po 2 hodinách při 25 °C teplotě je suspenze promyta puftrem užitým při reakci, neobsazená vazebná místa jsou blokována přidavkem 25 ml 1 mol/l etanolaminu po dobu 16 hodin při 4 °C.

Na sloupec alfa-laktalbumin-Sepharosy o rozměrech 1,6 x 40 cm se nanese 10 ml séra odebraného z imunizované kozy, vysyceného normálním lidským sérem v poměru 9:1 (9 objemových dílů antiséra s jedním objemovým dílem normálního lidského séra). Eluce specifické protilátky ze sloupce se provádí 0,1 mol/l glycinovým puftrem o pH 2,5. Po rychlé neutralizaci pevným tris-(hydroxymethyl)-aminometanem je bílkovina dialyzována proti vodě a lyofilizována.

Příprava pevné fáze s navázanou protilátkou: specifická protilátka je naředěna ve vazebném pufru uhličitán sodný - kyselý uhličitán sodný, 0,05 mol/l o pH 9,5 na optimální koncentraci, to je 5 mg/l. Objem 0,2 ml tohoto roztoku je sorbován 1 hodinu při 37 °C a dále 16 hodin při 4 °C na polystyrenovou zkumavku o objemu 5 ml. Po odsátí roztoku je zkumavka promyta, a to 1 x 0,5 ml pufovaného fyziologického roztoku o pH 7,2, 1 x 1 ml pufovaného fyziologického roztoku s 0,05 % objemovými polyoxyetylen-sorbitan monolaurátu a 1 x 1 ml pufovaného fyziologického roztoku. Do zkumavky se napipetuje 0,4 ml roztoku o koncentraci 0,5 % hmot. hovězího sérového albuminu v pufovaném fyziologickém roztoku a po 40 minutách při 25 °C se roztok odsaje.

Vazba alfa-laktalbuminu ze vzorku: objem 0,2 ml vzorku (např. séra) ředěného roztokem o 0,5 % hmot. hovězího sérumalbuminu v pufovaném fyziologickém roztoku je inkubován ve zkumavce s navázanou protilátkou po dobu 2 hodin při 37 °C. Po odsátí roztoku je opakovaně promytí zkumavky a to 1 x 0,5 ml pufovaného fyziologického roztoku, 2 x 1 ml pufovaného fyziologického roztoku s 0,05 % objemovými polyoxyetylen-sorbitan monolaurátu a 1 x 5 ml pufovaného fyziologického roztoku.

Vazba protilátky s navázaným enzymem: specifická protilátka s kovalentně navázanou peroxidázou se připraví reakcí 0,2 ml 1,25 % objemových glutaraldehydu s 10 mg peroxidázy o vhodné čistotě (RZ = 3), po 16 hodinách při teplotě 25 °C se volný glutaraldehyd oddialyzuje a přidá se 5 mg afinitně purifikované protilátky. Reakce probíhá 16 hodin při 4 °C. Po inkubaci s 0,1 ml 0,2 mol/l lysinu se roztok skladuje se shodným objemem glycerinu při -20 °C. Tento konjugát se naředí optimálně (to je na 2 až 4 mg bílkoviny/l, koncentrace kolísá podle šarže konjugátu) v roztoku 1 % hmot. sérového hovězího albuminu v pufovaném fyziologickém roztoku; 0,2 ml tohoto roztoku reaguje s imunokomplexem sorbovaným na zkumavce po dobu 2 hodin při 37 °C.

Po odsátí a promytí zkumavky (1 x 0,5 ml pufovaného fyziologického roztoku, 3 x 1 ml pufovaného fyziologického roztoku s 0,05 % objemovými polyoxyetylen-sorbitan monolaurátu a 1 x 5 ml pufovaného fyziologického roztoku), je navázaná peroxidáza stanovena přidavkem 0,3 ml roztoku substrátu, to je peroxidu vodíku o koncentraci 1 ml 30% roztoku/l s o-fenylendiaminem (0,22 mol/l) v 0,15 mol/l fosfát-citrátovém pufru o pH 5,0. Po 20 minutách je reakce zastavena přidavkem 2,5 ml kyseliny sírové (5,5 mol/l) a absorbance roztoku měřena při 492 nm. Koncentrace alfa-laktalbuminu v neznámých vzorcích je určena z kalibrační křivky za užití řady standardů alfa-laktalbuminu v rozsahu 0,1 až 4 ng ve vzorku, jejímiž body je proložena hyperbola druhého stupně.

P ř í k l a d 2

Specifická protilátka připravená postupem shodným jako v příkladu 1 je navázána na jamky mikrotitračních polystyrenových destiček za užití 0,1 ml roztoku o koncentraci 2,5 mg bílkoviny/l. Promytí i vysycení jamek hovězím sérumalbuminem se provádí naplněním jamek vždy až po okraj. Ve všech dalších reakčních krocích podle příkladu 1 se používá poloviční objem činidel.

P Ř E D M Ě T V Y N Ā L E Z U

Způsob kvantitativního stanovení alfa-laktalbuminu v tělních tekutinách a vodných roztocích, vyznačený tím, že tělní tekutina nebo vodný roztok obsahující alfa-laktalbumin se uvede do kontaktu s protilátkou proti alfa-laktalbuminu sorbovanou z roztoku o koncentraci 0,1 až 20 mg/l při teplotě 4 až 40 °C po dobu 1 až 72 hodin na pevný nosič, například na stěny jamek polystyrenové destičky, zbavený 3 až 5 násobným vymýváním například pufovaným fyziologickým roztokem s neiontovým detergentem nenasorbované protilátky proti alfa-laktalbuminu a nechá se reagovat za teploty 20 až 40 °C po dobu 1 až 5 hodin za vzniku imunokomplexu, načež po opětovém 3 až 5 násobném vymývání například pufovaným fyziologickým roztokem s neiontovým detergentem pevného nosiče se sorbovaný imunokomplex nechá reagovat s vodným roztokem protilátky proti alfa-laktalbuminu značené enzymem o koncentraci bílkoviny 0,1 až 20 mg/l, a to po dobu 1 až 5 hodin při 20 až 40 °C a po odstranění jejího nezreagovaného podílu se stanoví koncentrace enzymu, která je přímo úměrná koncentraci alfa-laktalbuminu.