



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

201614
(11) (B1)

(22) Přihlášeno 14 03 77
(21) (PV 1684-77)

(40) Zveřejněno 31 03 80

(45) Vydáno 15 07 82

(51) Int. Cl.³
G 01 N 33/56
A 61 K 39/395

(75)
Autor vynálezu

DVOŘÁK PAVEL ing., PRAHA a CHRPOVÁ MARIE, BABICE

(54) Způsob provádění radioimunologických analýz

Vynález se týká způsobu provádění všech radioimunologických analýz, při nichž se používá druhá protilátka.

Radioimunologická analýza je založena na imunologické reakci látky s protilátkou a na radioindikátorové detekci látky. Látka je sloučenina, která, zavedena při určitých podmínkách do živočišného organismu, je schopna vyvolat v něm obrannou imunologickou reakci. Protilátka je produkt žádoucí imunologické reakce organismu. S látkou vytváří komplex látka—protilátka. Nositel protilátky je globulinová frakce krevního séra, tzv. antiséra.

Při radioimunologické analýze je nejprve přidáno ke vzorkům obsahujícím neznámé množství sledované látky nadbytečné množství protilátky ve formě zředěného antiséra. Část protilátky vytvoří komplex látka—protilátka a zbývající část protilátky zůstává nezreagovaná v reakční směsi. Po ustavení reakční rovnováhy je k reakční směsi přidána sledovaná látka značená radionuklidem. V reakční směsi je potom přítomna značená látka jednak vázaná ve formě komplexu značená látka—protilátka, jednak volná — představovaná nezreagovaným podílem. Vzhledem k tomu, že reakce probíhá v podmínkách, kdy vzniká mikromnožství komplexu jsou roz-

puštěna, je nutno komplex značená látka—protilátka separovat z roztoku.

Jedním ze způsobů separace je použití druhé protilátky. Spočívá v tom, že na jiném živočišném druhu je imunizací připravena druhá protilátka vůči globulinům toho živočišného druhu, na němž byla připravena protilátka. Tato druhá protilátka vytváří s komplexem látka—protilátka separovatelný produkt.

Jedná-li se například o radioimunoanalýzu proteohormonů, provádí se separace volného a vázaného značeného hormonu tak, že druhá protilátka je přidávána do reakční směsi 4. den analýzy. Po inkubaci trvající 12 až 24 hodin je vzniklá sraženina odstředěna, určena radioaktivita vázaného a volného hormonu a z nich výsledné hodnoty analýzy. (Schams, D.: Untersuchungen über Prolaktin beim Rind., Z. für Tierphysiologie, Tiernahrung und Futtermittelkunde, Suppl. I. 1974, 1—125).

V současné době je například stanovení bovinního růstového hormonu prováděno takto: (Dvořák, P., Bečka, S., Krejčí, P., Chrpová, M.: Radioimmunoassay of bovine growth hormone., Radiochem. Radioanal. Letters 34, 1978, 155—160):

Do zkumavky jsou v uvedeném pořadí a

množství pipetovány následující látky a zpracovány jak níže uvedeno:

vzorek — 50 μ l krevního séra nebo plazmy,

nosič — 100 μ l plazmy králíka zředěné 300 $\times$,

protilátka — 100 μ l králíčího antiséra zředěného 9000 $\times$,

směs promíchána, inkubována přes noc
značený hormon — 100 μ l ^{125}I -bovinní růstový hormon,

směs promíchána inkubována 48 hodin

druhá protilátka — 100 μ l kozího antiséra zředěného 24 $\times$,

směs promíchána, inkubována přes noc
odstředění sedimentu

určení radioaktivity sedimentu

výpočet

Reagencia jsou ředěny pufrům, inkubace probíhají při teplotě přibližně 4 °C. Při zkrácení 2. inkubace z 48 hodin na 24 nastává významný pokles procenta vazby — o 15 až 25 %.

Hlavní nevýhodou tohoto postupu je jeho zdoluhavost. Celý trvá 5 dní, tj. v pracovním týdnu lze celé stanovení provést pouze jednou. Další nevýhodou je nutnost manipulovat 1., 2., 4. a 5. den se vzorky. V praxi to znamená, že první den musí připadnout na pondělí. Takto prováděná analýza je pracná co do manipulace. K jedné analýze je nutno pětikrát pipetovat a třikrát míchat, což je zvláště při analýze velkého počtu vzorků současně, zdrojem chyb.

Uvedené nedostatky jsou odstraněny způsobem provádění radioimunologických analýz, při nichž se používá druhé protilátky, použitelným pro kvantitativní analýzu všech látek, vůči nimž existuje protilátka. Podle vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že nejprve je 1/4 až 6 hodinovou precipitační reakcí mezi antisérem obsahujícím druhou protilátku a sérem živočišného druhu, na němž byla připravena protilátka, při teplotě 0 až 37 °C, vysráženo makromnožství nosičové suspenze — v podmínkách 1 až 100 násobného přebytku antiséra, než činí množství potřebné pro 80 % precipitaci séra — a poté je přidáním antiséra s protilátkou připraveno, při teplotě 0 až 37 °C reakcí trvající nejméně 1/4 hodiny, na tomto nosiči mikromnožství precipitované protilátky vázané na pevné fázi, přičemž množství a zředění antiséra musí být takové, aby se na pevnou fázi navázalo 0,1 až 100 % protilátky obsažené v antiséru. Pro precipitační reakci je výhodná teplota 4 °C a doba trvání 2 hodiny. Při přípravě mikromnožství precipitované protilátky vázané na pevnou fázi je výhodnou reakční teplota 4 °C, přičemž množství a zředění antiséra je takové, aby se na pevnou fázi vázalo 50 % protilátky obsažené v antiséru. Místo séra antisér je možno při tomto provádění analýz použít krevní plazmy.

Použitím způsobu provádění radioimunologických analýz podle vynálezu se podstatně zkracuje doba nutná k provedení analýzy. Analýza proteohormonů trvá 3 dny oproti 5 při dřívějším způsobu. Za předpokladu, že protilátka vázaná na pevnou fázi je připravena do zásoby, lze analýzu zahájit v pondělí a ukončit ve středu, kdy je zároveň zahájena další analýza, která je ukončena v pátek. Týdenní analyzované množství vzorků je dvojnásobné. Analýzu je možno zahájit rovněž v úterý. Zdvojnásobuje až ztrojnásobuje se tedy počet dní, kdy je možno analýzu zahájit. Snižuje se manipulační pracnost, k jedné analýze je nutno pipetovat třikrát, dříve pětikrát a míchat dvakrát, dříve třikrát. Celkový počet manipulací se snižuje z osmi na pět. Suspenzi lze pipetovat, což zachovává všechny přednosti tohoto způsobu dávkování.

Vynález lze využít ke zkrácení a zjednodušení radioimunologických metod, zvláště ve zdravotnictví, farmakologii, zemědělství a dalších biologických vědách. Je možno jej uplatnit v komerčních kitech.

Příklad 1

Radioimunologické stanovení růstového hormonu. První protilátka je králíčí, druhá kozí. Reagencie jsou ředěny do fosfátového pufru, inkubace probíhají přibližně při teplotě 4 °C.

Příprava suspenze precipitované protilátky: v baňce je smíchán jeden díl kozího antiséra zředěného 8 krát, což odpovídá minimálně 95 % vazbě s jedním dílem séra králíka zředěného 100 krát. Směs je promíchána a inkubována 2 hodiny. Poté je přidán jeden díl králíčího antiséra, obsahujícího protilátku vůči bovinnímu růstovému hormonu, zředěného 3000 krát. Toto zředění odpovídá 50 % vazbě. Směs je inkubována 12 hodin. Vzniklá suspenze je stabilní a lze ji připravit do zásoby na několik dnů. Před použitím při vlastní analýze nutno suspenzi promíchat.

Vlastní radioimunoanalýza: do zkumavek se pipetuje 50 μ l analyzované tekutiny, 100 μ l suspenze precipitované protilátky, směs se promíchá a inkubuje přes noc. Poté se přidá 100 μ l roztoku ^{125}I -bovinního růstového hormonu, směs se promíchá a inkubuje přes noc. Sediment se odstředí, kapalná fáze oddělí a po změření radioaktivity sedimentu gama spektrometrem, provede výpočet výsledků podle FELDMAN, H., RODBARD, D.: Mathematical theory of radioimmunoassay. In: Principles of competitive protein binding assays, Edt: ODELL, W. D., DAUGHADAY, W. H., str. 158–203, Lippincott, Philadelphia—Toronto, 1971.

Příklad 2

Radioimunologické stanovení testosteronu. První protilátka je králíčí, druhá ovčí. Reagencie jsou ředěny do fosfátového pufru, inkubace probíhají přibližně při teplotě 4 °C.

Příprava suspenze precipitované protilátky: v baňce je smíchán jeden díl ovčího antiséra zředěného 15 krát — toto zředění odpovídá minimálně 95 % vazbě — s jedním dílem plazmy králíka zředěné 100 krát. Směs je promíchána a inkubována 1 hodinu. Poté je přidán jeden díl králíčího antiséra, obsahujícího protilátku vůči testosteronu, zředěného 8000 krát. Toto zředění odpovídá 50 % vazbě. Směs je inkubována přes noc při teplotě 4 °C a lze ji připravit do zásoby na několik dnů.

Vlastní radioimunoanalýza: do zkumavek se pipetuje 100 µl analyzované tekutiny, 100 µl suspenze precipitované protilátky a směs se promíchá a inkubuje 6 hodin. Poté se přidá 100 µl roztoku ³H-testosteronu, směs se promíchá a inkubuje přes noc. Sediment se odstředí, radioaktivita kapalně fáze změřena na kapalinovém scintilačním spektrometru a výpočet provede podle citace uvedené v příkladu 1.

Příklad 3

Radioimunologické stanovení humánního prolaktinu. První protilátka je králíčí, druhá koží. Reagencie jsou ředěny do fosfátového

pufru, inkubace probíhají při teplotě přibližně 4 °C.

Příprava suspenze precipitované protilátky: ve skleněné baňce je smíchán jeden díl koží plazmy obsahující druhou protilátku zředěné 25 krát s jedním dílem séra králíka zředěného 100 krát. Zředění koží plazmy odpovídá minimálně 95 % vazbě. Směs je promíchána a inkubována 3/4 hodiny. Poté je přidán jeden díl králíčího antiséra, obsahujícího protilátku vůči humánnímu prolaktinu. Toto antisérum je zředěno 27 000 krát, což odpovídá 50 % vazbě. Směs je inkubována 16 hodin, vzniklá suspenze je stabilní a lze uchovávat několik dnů. Před upotřebením je nutno ji promíchat.

Vlastní radioimunoanalýza: do zkumavek se pipetuje 20 µl analyzované tekutiny a 100 µl suspenze precipitované protilátky. Směs se promíchá a inkubuje přes noc. Poté se přidá 100 µl roztoku ¹²⁵I-humánního prolaktinu a po promíchání inkubuje přes noc. Sediment se odstředí, kapalná fáze oddělí a po změření radioaktivity sedimentu provede výpočet podle citace uvedené v příkladu 1.

Změření radioaktivity a výpočet výsledných hodnot jsou běžné rutinní metody obecného charakteru.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob přípravy precipitované protilátky k provádění radioimunologických analýz, při nichž se používá druhé protilátky, použitelný pro kvantitativní analýzu všech látek, vůči nimž lze připravit protilátku, vyznačující se tím, že nejprve je 1/4 až 6 hodinovou precipitační reakcí mezi antisérem obsahujícím druhou protilátku a sérem živočišného druhu, na němž byla připravena protilátka, při teplotě 0 až 37 °C, vysráženo makromnožství nosičové suspenze v podmínkách 1 až 100násobného přebytku antiséra, než činí množství potřebné pro 80 % precipitaci séra a poté je přidáním antiséra s protilátkou připraveno při teplotě 0 až 37 °C reakcí trvající nejméně 1/4 hodiny, na tomto nosiči mikromnožství precipitované protilátky vázané na pevné fázi, přičemž množství a zředění antiséra musí být takové, aby se na pevnou fázi navázalo 0,1 až 100 % protilátky obsažené v antiséru.
2. Způsob provádění radioimunologických analýz podle bodu 1, vyznačující se tím, že precipitační reakce probíhá při teplotě 4 °C po dobu dvou hodin.
3. Způsob provádění radioimunologických analýz podle bodu 1, vyznačující se tím, že při přípravě mikromnožství precipitované protilátky vázané na pevné fázi, probíhá reakce při teplotě 4 °C a množství a zředění antiséra musí být takové, aby se na pevnou fázi vázalo 50 % protilátky obsažené v antiséru.
4. Způsob provádění radioimunologických analýz podle bodu 1 až 3, vyznačující se tím, že místo sér nebo antisér jsou použity krevní plazmy.