



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

219900
(11) (B2)

(51) Int. Cl.³
G 01 N 33/54

(22) Přihlášeno 28 04 81
(21) (PV 3163-81)

(32) (31) (33) Právo přednosti od 30 04 80
(P 30 16 575.4)
Německá spolková republika

(40) Zveřejněno 30 07 82

(45) Vydáno 15 09 85

(72)
Autor vynálezu NEUMANN SIEGFRIED dr., GUNZER GERHARD dr., HENNRICH NORBERT dr., LANG HERMANN dr., DARMSTADT (NSR)

(73)
Majitel patentu MERCK PATENT GESELLSCHAFT MIT BESCHRÄNKTER HAFTUNG, DARMSTADT (NSR)

(54) Způsob imunologického stanovení enzymů a prostředek k provádění tohoto stanovení

1

2

Vynález se týká způsobu a prostředku pro imunologické stanovení enzymů, které s inhibítozem tvoří komplex enzym-inhibitor, obzvláště pro stanovení proteolytických enzymů. Způsob stanovení enzymů za pomoci protilátek stanoveného enzymu, vázaných na ve vodě nerozpustný nosič, je vyznačený tím, že se enzymy, které s inhibítozem tvoří komplex enzym-inhibitor, inkubují s vázanými protilátkami, reakční roztok se odstraní, promytý nosič s protilátkou, nasycený komplexem enzym-inhibitor, se nechá inkubovat s produktem kopulace, vytvořeným z protilátky specificky reagující s inhibítozem a ze značené substance, nenavázaný produkt kopulace se odstraní a míra určované koncentrace enzymu se zjistí na základě koncentrace značené substance na pevné fázi.

Vynález se týká způsobu a prostředku pro imunologické stanovení enzymů, které s inhibítorem tvoří komplex enzym-inhibitor, obzvláště pro stanovení proteolytických enzymů.

Při zánětlivých procesech hrají proteázy z polymorfních leukocytů a makrofágů zásadní roli při poškozování přítomné tkáně. Leukocytární proteázy, jako je například elastáza nebo kollagenáza, jsou lokalizovány v lysosomech bílých krvinek a po patologickém podráždění jsou vylučovány do extracelulárního prostředí. Způsobují zde odbourávání tkáňových vazebných substancí a po vstupu do krevního oběhu způsobují poruchy homeostázy například odbouráváním srážecích faktorů a fibrinogenu. Kvantitativní důkaz leukocytárních proteáz v krvi je tedy velmi cenný pro posouzení akutity zánětlivého onemocnění, pro pozorování průběhu při chronických zánětech, pro kontrolu terapie a pro prognostiku. Stanovení těchto faktorů se jeví jako nutné zvláště tehdy, když v souvislosti s onemocněním nastává leukocytóza, jako například při určitých infekčních nemocech, intoxikacích, nekrose tkáně, endokrinologických onemocněních, maligních nádorech a podobně.

Exaktní kvantitativní důkaz proteáz leukocytů v krvi byl dosud ztěžován tím, že tyto proteolytické enzymy při vstupu do krevního oběhu tvoří rychle komplexy s inhibitory proteolytických enzymů, které jsou v krvi bohatě zastoupeny, jako je například alfa₁-antitrypsin, alfa₂-makroglobulin a podobně. Komplexy s alfa₁-antitrypsinem jsou stechiometricky stavěné sloučeniny z jedné molekuly proteolytického enzymu a jedné molekuly inhibitoru za tvorby kovalentní vazby. V uvedeném komplexu je proteáza enzymaticky inaktivní. Z tohoto důvodu je stanovení enzymatické aktivity zcela nevhodné pro kvantitativní zjištění koncentrace proteolytických enzymů v plazmě, séru nebo také v jiných tělních tekutinách, jako je synoviální kapalina exsudát, tkáňový extrakt a podobně.

Z leukocytárních proteolytických enzymů má elastáza (EC 3.4.21.11) obzvláštní význam: Ve značném množství se vyskytuje v leukocytech a představuje společně s kollagenázou 5 % sušiny granulocytů. Tento enzym má nepatrnou substrátovou specifitu a může proteolyticky odbourávat mnoho různých, biologicky důležitých látek, jako je například elastin, proteoglykany, kollagen, imunoglobulin, faktory komplementu, fibrinoge a srážecí faktory. Elastáza je v plazmě z 92 % vázaná na alfa₁-antitrypsin a z 8 % vázaná na jiné molekuly inhibitorů. Komplexy z elastázy a alfa₁-antitrypsinu byly prokázány při zánětlivých procesech například v plazmě, séru, peritoneální kapalině, hnisu a podobně.

Vzhledem k tomu, že proteolytické enzymy jsou v tělních tekutinách stále vázané na inhibitory, je jejich důkaz možný prak-

ticky pouze za pomoci imunologických metod. Známé takové metody jsou například elektroimunodifúze, radioimunologický test a aglutinační test, popřípadě test blokování aglutinace. Uvedené metody však mají značné nevýhody. Elektroimunodifúze je zdlouhavá a pro rutinní stanovení nevhodná; vyhodnocení je pouze kvalitativní a špatně reprodukovatelné. Radioimunologický test je rovněž časově náročný a je nevýhodný kvůli použití radioaktivních látek. Obzvláštní nevýhody jsou následující:

Nutnost speciálních laboratorních zařízení, zvláštní bezpečnostní opatření kvůli nebezpečí ozáření, nepatrná stabilita radioaktivně značených substancí, zabezpečení a podobně.

Z DOS č. 2/6 41 840 je známý aglutinační test, při kterém se zkoumaná plazma uvádí do styku se suspenzí částecek syntetické pryskyřice nebo částecek krve, na jejichž povrchu je nanášena protilátka komplexu enzym-inhibitor, a potom se bezprostředně pozoruje, zda aglutinace nastává nebo ne. Uvedená metoda má tu nevýhodu, že poskytuje pouze semikvantitativní výsledky a nelze ji používat jako rutinního stanovení. Použité protilátky je třeba pomocí nákladných výrobních způsobů převést na specifickou formu pro antigenní determinanty, které jsou přítomny pouze v komplexech enzym-inhibitor.

V DAS č. 22 06 103 je popsána metoda, při které se nechá reagovat jedna určovaná komponenta se zakotveným vazebným členem a jeden z obou těchto vazebných členů se stanoví pomocí molekul indikátoru značených enzymem. Specifické kvantitativní stanovení komplexu enzym-inhibitor tedy pomocí této metody není možné.

Předložený vynález tedy řeší úkol vypracovat způsob a prostředek pro kvantitativní stanovení enzymů, které se vyskytují ve formě komplexů enzym-inhibitor, pomocí kterého by bylo možno odstranit nevýhody známých metod.

Podle předloženého vynálezu je tento úkol vyřešen tak, že se komplex enzym-inhibitor naváže za pomoci zakotvené fáze protilátky enzymového podílu a potom následuje stanovení pomocí značené protilátky inhibitorového podílu molekulové vazby.

Předmětem předloženého vynálezu tedy je způsob stanovení enzymů za pomoci protilátek stanovovaného enzymu, vázaných na ve vodě nerozpustný nosič, který je charakterizovaný tím, že se enzymy, které tvoří s inhibítorem komplex enzym-inhibitor, inkubují s vázanými protilátkami, reakční roztok se odstraní, promytý nosič s protilátkou, nasycený komplexem enzym-inhibitor, se inkubuje s produktem kopulace, vytvořeným z protilátky specificky reagující s inhibítorem a značkové substance, nenavázaný produkt kopulace se odstraní a míra koncentrace určovaného enzymu se zjistí na

základě koncentrace značené substance na pevné fázi.

Dále se předložený vynález týká prostředku k provádění tohoto způsobu, který se stává z reakční nádoby potažené protilátkou stanovovaného enzymu a z produktu kopulace, tvořeného z protilátky specificky reagující s inhibitorem a značkové substance.

Dalším předmětem předloženého vynálezu je použití tohoto prostředku ke stanovení enzymů, které s inhibitory tvoří komplexy enzym-inhibitor.

Pomocí způsobu a prostředku podle předloženého vynálezu je možno principiálně stanovovat všechny enzymy, které mohou s inhibitorem tvořit komplex enzym-inhibitor, a které proto není možno stanovit přímým měřením enzymatické aktivity. Předložený vynález je obzvláště vhodný ke stanovení komplexů proteolytických enzymů se vždy relevantními inhibitory proteáz, jako je např. elastáza/alfa₁-antitrypsin, thrombin/antithrombin III, plasmin/antiplasmin, trypsin/alfa₁-antitrypsin a podobně.

Tento způsob je specifický, jednoduchý, rychlý a citlivý. Pro jeho provádění jsou potřebné pouze tři specificky vyrobené reakční složky (reakční nádoba potažená protilátkou, enzymem značená protilátka, roztok s definovanou koncentrací komplexu enzym-inhibitor), přičemž provádění je možné s aparativním vybavením běžné klinicko-chemické laboratoře.

Způsob je založen na tvorbě specifické vazby komplexu enzym-inhibitor na imobilizované protilátce enzymu a na následujícím kvantitativním stanovení vázaného komplexu se značenou protilátkou inhibitoru. Pro důkaz se tedy používají dvě antiséra s absolutně rozdílnou vazebnou specifitou, totiž specifická pro jeden z obou členů molekulové vazby.

Specifický reaktant pro proteolytický enzym, vyskytující se například v komplexu proteolytický enzym-inhibitor proteázy, se zakotví na pevný nosič. Reaktanty specifickými pro proteolytické enzymy jsou protilátky nebo jejich fragmenty, vázající antigen. Specifické preparáty protilátek se izolují ze specificky imunizovaných zvířat. Jako imunogeny se používají proteolytické enzymy v neúčinném stavu po reakci s nízkomolekulárními inhibitory, nebo také v nezpracovaném stavu. Vhodnými pokusnými zvířaty pro přípravu antisér jsou například ovce nebo králíci, vhodná jsou však také jiná pokusná zvířata.

V pevné fázi používané protilátky proteolytických enzymů je možno použít také bez nosiče, například po zesítnění pomocí polyfunkčních činidel, jako jsou například dialdehydy, dioxidy a podobně, čímž se stanou nerozpustnými. Výhodně se ale protilátky vážou na pevný nosný materiál. Pevný nosič může sestávat z materiálu, který je inertní k reakčním složkám používaným při testu a na který je možno protilátky proteolytických enzymů připojit.

Vhodnými nosiči jsou například tvarová tělíska, jako amorfni částice, kuličky, destičky, fólie nebo reakční nádoby z anorganického materiálu (např. sklo) nebo organického materiálu (například homopolymery nebo kopolymery vinylových sloučenin jako olefinů, vinylacetátu, vinylchloridu, vinilidenchloridu, tetrafluorethylenu, styrenu, kyseliny arkylové nebo metakrylové, dále polymery formaldehydu a cyklických acetalů, jakož i polykondenzáty, jako je polyester, polykarbonáty nebo polyamidy, nebo zesítněné uhlohydráty a zesítněné polypeptidy), a dále biologické částice, jako jsou například buňky (erythrocyty).

Vazba protilátky na pevný nosič může být adsorpční, adhesní nebo případně kovalentní. Je možné fixovat protilátku na pevný nosič pomocí běžných metod chemie peptidů kovalentní vazbou biologicky aktivních polypeptidů. Typickými metodami tohoto je aktivace povrchu nosiče bromkyanovou metodou nebo povrchové zesítnění protilátky na činidel, jako je glutardialdehyd a podobně.

Bylo zjištěno, že u rozličných nosičů se mohou protilátky proteáz na povrch nosné látky dostatečně pevně vázat adsorpcí nebo adhesí. Při potahování se nosič uvádí do styku s protilátkou nebo s jejími antigen vázajícími fragmenty. Například se protein rozpustí ve vodném roztoku, výhodně v 0,15 M roztoku chloridu sodného nebo v isotonicném roztoku chloridu sodného pufovaném fosfátem (dále zkracováno na PBS) o pH 7,2 o koncentraci proteinu 1 μg/l až 1 g/l, výhodně 10 mg/l. Roztok proteinu se vyrobí zředěním krevní plazmy nebo krevního séra specificky imunizovaných zvířat, výhodně ale rozpuštěním čištěného imunoglobulinu z antiséra. Roztok se nechá stát s nosičem po dobu v rozmezí jedné minuty až pěti dnů, výhodně po dobu 24 h. Potom se roztok od nosiče oddělí, například slitím z nádoby, a nosič se promyje pufrům, který výhodně obsahuje detergent (například PBS o pH 7,2 s 0,05 % hmotnostními polyoxyethylensorbitanmonolaurátu).

Stanovení komplexů proteolytický enzym-inhibitor proteázy se provádí tím způsobem, že se nosič, který byl potažen specifickou protilátkou stanoveného enzymu nebo fragmenty vázajícími antigen této protilátky, inkubuje po dobu v rozmezí jedné minuty až 48 hodin, výhodně po dobu 2 hodin, s komplexem proteolytický enzym-inhibitor proteázy obsaženém v kapalině, například se vzorkem séra. V paralelním stanovení se použije vzorek o známé koncentraci komplexu proteolytický enzym-inhibitor proteázy. Tyto vzorky se připraví zředěním reakční směsi z vysoce čisté proteázy a vysoce čistého inhibitoru proteázy v pufru (například PBS o pH 7,2) nebo v lidské plazmě, která byla předem inaktivována po dobu 30 minut při teplotě 56 °C.

Potom se takto zpracovaný nosič po inkubaci zbaví roztoku a kvůli odstranění přebytkové kapaliny a zbytků vzorku se promy-

je puřrem (napřříklad PBS při pH 7,2). Potom se tento nosič inkubuje s roztokem značkovaneho druhého reakčního členu, který je specifický pro komplexně vázaný inhibitor proteázy. Doba inkubace závisí na určitém rozsahu podmínek se zřetelem na hodnotu pH, teplotu a koncentraci. Všeobecně se doba působení pohybuje v rozmezí 2 až 24 hodin. Reaktanty pro tento reakční stupeň jsou protilátky nebo fragmenty protilátek, které jsou řízeny proti antigenním determinantům komplexně vázaných molekul inhibitoru proteolytických enzymů.

Specifické preparáty protilátek se izolují ze séra specificky imunizovaných zvířat. Jako účelné se ukázalo obohacování protilátkových frakcí z těchto antisér postupem imunoabsorpce na immobilizovaném antigenu a oddělení od protilátek neznámé specificity.

Jako značkovací látky pro druhé reaktanty se používají například enzymy, luminiscenční značkovací látky, fluorescenční nebo radioaktivní substance. V rámci předloženého vynálezu jsou výhodné použít takové značkovací enzymy, jejichž aktivita se dá lehce zjistit optickým testem, obzvláště při barevné reakci ve viditelném světle nebo při změně koncentrace NADH nebo NADPH. Typické příklady vhodných značkovacích enzymů jsou alkalické fosfatázy, peroxidázy, glukosooxidázy, alfa-galaktosidáza, beta-galaktosidáza, glukooamyláza, invertáza, maltodehydrogenáza nebo glukoso-6-fosfát-dehydrogenáza.

Kovalentní vazby značkovacích enzymů se specifickými protilátkami inhibitorů proteolytických enzymů nebo antigen vázajících fragmentů protilátek se získají podle způsobů popsaných v literatuře [například J. Histochem. Cytochem. **22**, 1084 (1974); Bull. Soc. Chim. Biol. **50**, 1169 (1968)].

V testu používané optimální zředění značených protilátek komplexně vázaných inhibitorů proteolytických enzymů se zjistí pomocí předběžných pokusů. Nesmí na nosič přivádět žádné nespecifické sloučeniny, to znamená, že nesmí být zjištěna přítomnost těchto sloučenin na na nosiči vázaném komplexu proteolytický enzym-inhibitor proteáza. K tomuto účelu se k roztoku značkované protilátky přidává detergentní látka, například jeden milimol natriumdodecylsulfátu.

Po ukončení inkubace se roztok oddělí od nosiče, například slitím z nádoby, nosič se několikrát promyje puřrem, který účelně obsahuje detergent a potom se běžným způsobem stanoví množství značkovací substance, vázané na nosiči. Pro kontrolu nespecifické vazby značkovací substance na nosič se provádí pokus stejně jako je výše popsáno, avšak bez komplexu proteolytického enzymu a inhibitoru proteázy stanoveného složení.

Obsah komplexu proteolytický enzym-in-

hibitor proteázy se stanovovaným proteolytickým enzymem v biologickém vzorku se určí srovnáním s výše popsanými standardními zkouškami.

Prostředek podle předloženého vynálezu může dodatečně obsahovat ještě běžná stabilizační činidla, jako jsou proteinová aditiva (albumin hovězího séra nebo ovalbumin), uhlohydráty, glycerin, bakteriostatika, fungicidy a podobně.

Vynález je blíže objasněn následujícími příklady.

Příklad 1

Kvantitativní imunologický důkaz komplexů z leukocytové elastázy a alfa₁-antitrypsinu

a) Výroba antiséra leukocytové elastázy

Elastáza se získává z lidských polymorfních leukocytů a tak dlouho se čistí afinitní chromatografií a chromatografií na iontoměničích, až při elektroforéze na gelu polyakrylamidu při pH 4,3 a při imunoelatroforéze s antisérem proteinů lidského séra nejsou zjistitelné žádné znečišťující jiné proteiny. Lyofilizovaný protein prostý solí se rozpustí v 0,15 M roztoku chloridu sodného na koncentraci 2 mg/ml. Jeden ml tohoto roztoku se emulguje s 1 ml kompletního Freundova adjuvans. Tato emulze se injekčně aplikuje ovcím nebo kozám na třech až čtyřech místech v oblasti zadního břišku intramuskulárně. Stejně injekce se podají ještě dvakrát v období vždy tří týdnů. 21 dnů po poslední injekci se odebere krev. Další injekce se podávají v odstupu 12 týdnů po posledním odběru krve. Vždy 14 dní po injekci se odebírá krev. Sérum se z krve získá běžným způsobem, stabilizuje se přidáním 0,05 % hmotnostních azidu sodného, jakož i 0,05 % hmotnostními natriumethylyrtuthiosalicylátu a skladuje se při -20 °C.

b) Výroba antiséra alfa₁-antitrypsinu

Jako antigen se použije vysoce čistý alfa₁-antitrypsin z lidské plazmy. Antisérum alfa₁-antitrypsinu se získá z ovcí nebo koz stejným způsobem, jako je popsáno v předchozím odstavci a). Pro imunizaci králíků se rozpustí 1 mg lyofilizovaného alfa₁-antitrypsinu prostého solí v 0,5 ml 0,15 M roztoku chloridu sodného. Tento roztok se emulguje s 0,5 ml kompletního Freundova adjuvans a emulze se injikuje zvířatům intramuskulárně ve třech místech do zadního břišku. Stejná emulze se po čtyřech týdnech aplikuje subkutánně do týla zvířat. Po sedmi dnech se odebere asi 40 ml krve z marginální ušní cévy. Po čtyřech týdnech se podává vždy další injekce subkutánně a v odstupu 7 dnů se vždy odebírá krev. Sé-

rum se zpracovává stejně jako je výše popsáno v odstavci a).

c) Izolace imunoglobulinu z antiséra

Imunoglobulinová frakce se z antiséra elastázy, popřípadě alfa₁-antitrypsinu se běžnými způsoby ze sér izoluje [Scand. J. Immunol. **2**, Suppl. 1, 161 (1973) nebo Arch. Biochim. Biophys. **134**, 279 (1969)] a skladuje se v lyofilizované formě prosté soli.

d) Čištění protilátek alfa₁-antitrypsinu imunoadsorpcí

Protilátka inhibitoru proteolytických enzymů se imunospécificky izoluje chromatografií přečištěného imunoglobulinu [získaného podle odst. c)] z antiséra alfa₁-antitrypsinu [podle odst. b)] přes Sepharosu 4B nebo přes substituovanou agarosu, která obsahuje kovalentně vázaný alfa₁-antitrypsin. Protilátka inhibitoru proteolytického enzymu zůstává na imobilizovaném antigenu a eluuje se pomocí 0,1 M pufru glycin/kyselina chlorovodíková o pH 2,8 nebo 3 M roztokem rhodanidu draselného. Tímto způsobem se imunospécificky izoluje asi 5 až 20 procent hmotnostních přítomného imunoglobulinu. Imunoglobulin s jinou specifikou se tímto způsobem tedy odstraní. Eluát se specifickými protilátkami se dialyzuje proti fosfátem pufovanému solnému roztoku a potom proti 0,01 M roztoku hydrogenuhlíčitanu amonného. Potom se získaný protein vysuší lyofilizací.

e) Výroba konjugátů enzym—protilátka

Imunospécificky přečištěná protilátka [podle odstavce d)] se zesítí s alkalickou fosfatázou z telecího tenkého střeva za použití 0,2 % hmotnostního glutardialdehydu [Biochim. Biophys. Acta **251**, 427 (1971)]. Reakční produkt se chromatografuje přes sloupec Bio-gelu A 1,5 m (26 mm × 900 mm). Komplexy enzym-protilátka byly získány v prvním maximu AP-aktivity eluátu. Získaný roztok se stabilizuje přidávkou ovalbuminu (0,1 % hmotnostních) a azidu sodného (0,05 % hmotnostních) a skladuje se při 4 °C.

f) Potažení reakčních nádobek protilátkami elastázy

Protilátky elastázy, vyrobené způsobem popsaným v odstavci a) a přečištěné způsobem popsaným v odstavci c) se imobilizují adsorpcí na reakční nádoby z umělé hmoty. Jako reakční nádoby se použijí zkumavky z polystyrenu o velikosti 12 × 55 mm, kulaté kyvety nebo destičky pro mikrotitraci. V typickém provedení se zkumavky nebo kyvety naplní 1 ml roztoku imunoglobulinu o koncentraci 10 µg imunoglobulinu/ml (v 0,15 M roztoku chloridu sod-

ného s 0,02 % hmotnostního azidu sodného). Pro destičky se pro zásobu používá 0,2 ml roztoku imunoglobulinu o koncentraci 50 µg/ml. Nádoby se uzavřou a nechají se potom stát přes noc při teplotě 4 °C. Před použitím při testu se kapalina dekantuje nebo odsaje. Nádoby se potom několikrát promyjí promývacím roztokem (0,15 M roztok chloridu sodného s 0,05 % hmotnostního detergentu a 0,02 % hmotnostního azidu sodného) a krátce se na vzduchu usuší.

g) Výroba komplexu leukocytické elastázy a alfa₁-antitrypsinu

Jako analytický vzorek pro kvantitativní důkaz se vyrobí komplex z proteolytického enzymu a inhibitoru proteázy in vitro inkubací obou izolovaných vysoce čistých komponent. K tomu se smísí 0,2 ml roztoku 0,5 miligramu čisté humánní leukocytické elastázy v 1 ml (rozpuštěno v 10 mM pufru Tris/kyselina chlorovodíková o pH 7,4 s 0,12 M chloridem sodným) a 0,2 ml roztoku 2,8 mg čistého alfa₁-antitrypsinu (z humánní plasmy) v 1 ml (rozpuštěno v 50 mM pufru Tris/kyselina chlorovodíková o pH 8,8 s 0,05 M chloridem sodným) a tato směs se potom inkubuje po dobu 2 hodin při teplotě 37 °C. Skladování této směsi se potom provádí při teplotě -20 °C.

Analýza pomocí imunoelektroforézy ukázala, že na komplex elastáza/alfa₁-antitrypsin zreagovala veškerá elastáza přítomná v inkubační směsi.

h) Znovunalezení komplexu z leukocytární elastázy a alfa₁-antitrypsinu

Na mikrotitrační destičky, které byly způsobem popsaným v odstavci f) potaženy protilátkou elastázy a připraveny k použití, se naplní 0,2 ml vzorku s obsahem 0,1 až 10 ng elastázy v inhibitorovém komplexu pro depot. Vzorky s definovaným obsahem elastázy se získají zředěním směsi enzymu a inhibitoru podle odstavce g); jako zředovací činidlo slouží fosfátem pufovaný solný roztok. Pro stanovení srovnávací hodnoty se některé depoty naplní paralelně 0,2 ml zředovacího prostředku bez komplexu enzym-inhibitor. Po inkubaci po dobu 2 hodin při teplotě místnosti se obsah depotu odsaje. Potom se třikrát promyje fosfátem pufovaným solným roztokem a naplní se roztokem konjugátu enzym-protilátka, získaným podle odstavce e) (0,2 ml pro depot). Roztok měl 800 jednotek/l aktivity alkalické fosfatázy. Zředovacím prostředkem zde byl 10 mM pufr Tris/kyselina chlorovodíková o pH 7,5 se 2 mM chloridu hořečnatého, 0,025 mM chloridu zinečnatého, 1 % hmotnostním ovalbuminu, 1 mM natriumdodecylsulfátu a 0,02 % hmotnostních azidu sodného. Přístup vzduchu k destičkám byl uzavřen a tyto byly inkubovány při teplotě místnosti přes noc. Po této inkubaci se kapalina odsaje. Destičky se třikrát promyjí a krátce se na vzdu-

chu vysuší. Potom se pro zjištění aktivity alkalické fosfatázy naplní roztokem pufr-substrát v množství 0,2 ml pro depot v časové řadě. Po deseti minutách inkubace při teplotě místnosti se reakční směs z depota převede do mikrokvyety a měří se extinkce. Jako nulová hodnota slouží hodnota extinkce roztoku pufru a substrátu. Depot bez přídatku proteinu představuje extinkci, která je mírou pro nespecifickou adsorpci konjugátu enzym-protilátka na depot. V depotu, který obsahoval komplexy proteolytického enzymu a inhibitoru proteázy, byla zjištěna zvýšená hodnota extinkce. Pro vyhodnocení se srovnává zjištěná extinkce (minus extinkce pro nespecifickou adsorpci) použitého množství elastázy (ng) v inhibitorovém komplexu. Následující tabulka udává konečné hodnoty extinkce při 405 nm po deseti-minutové reakční době v závislosti na množství elastázy.

elastáza (ng)	OD ₄₀₅ /10 min
12,5	1,000
6,25	1,030
3,125	0,830
1,563	0,540
0,781	0,315
0,390	0,115
0,195	0,030
0 — kontr.	0,0

Výsledky ukazují, že koncentrace komplexů elastáza- α 1-antitrypsin, se může tímto způsobem kvantitativně stanovit. Existuje úzce korelující souvislost mezi množstvím asi 0,4 ng až 6 ng komplexně vázané elastázy ve vzorku a změřenou extinkcí. Jako roztok pufr-substrát se použije roztok, který má v testu následující koncentrace: 10 mM p-nitrofenylfosfát, 0,5 mM chlorid hořečnatý, 1,0 mM pufr diethanolamin/kyselina chlorovodíková o pH 9,8.

Příklad 2

Kvantitativní imunologický důkaz komplexu thrombinu a antithrombinu III

a) Isolace imunoglobulinu z antisera

Jako zdroj specifických protilátek proteáz a inhibitorů proteolytických enzymů se použijí komerčně získatelná antisera králíků pro lidský prothrombin, popřípadě pro antithrombin III z lidské plazmy. Imunoglobulinové frakce z těchto antisér se známými způsoby izolují a skladují se v lyofilisované formě prosté soli.

b) Výroba enzymem značených protilátek lidského antithrombinu III

Způsobem podle odstavce a) izolovaná imunoglobulinová frakce z antisera antithrombinu III lidského se se značícím enzy-

mem chemicky kovalentně sváže alkalická fosfatáza z telecího tenkého střeva a tímto způsobem vyrobené konjugáty z imunoglobulinu a enzymu se dále zpracují analogicky, jako je popsáno v odstavci 1e).

c) Potažení reakčních nádobek protilátkami prothrombinu

Podle odstavce a) vyčištěná frakce imunoglobulinu z antisera lidského prothrombinu se imobilisuje adsorpcí na nádobkách z umělé hmoty. K tomu se použijí mikrotitrační destičky z polystyrenu, které se plní 0,2 ml pro depot roztoku 50 μ g imunoglobulinu pro jeden ml (v 0,15 M roztoku chloridu sodného s 0,02 % azidu sodného). Destičky se vzduchotěsně uzavřou a nechají se stát přes noc při teplotě 4 °C. Před použitím v testu se kapalina obsahující imunoglobulin odstraní. Nádobky se několikrát promyjí 0,15 M roztokem chloridu sodného, který obsahuje ještě 0,05 % hmotnostních detergentu a 0,02 % hmotnostních azidu sodného a potom se krátce vysuší na vzduchu.

d) Výroba molekulárních komplexů z lidského thrombinu a lidského antithrombinu III

Komplexy z lidského thrombinu a antithrombinu pro použití jako analytický vzorek v testu se vyrobí inkubací směsí obou komponent ve vysoce čisté formě. K tomu účelu se inkubuje 50 jednotek antithrombinu III (= heparinový kofaktor) a 50 jednotek heparinu v objemu 1,26 ml v 10 mM pufru tris/kyselina chlorovodíková o pH 7,5 po dobu 30 minut a při teplotě 37 °C. Po této inkubaci se k reakční směsi přidá 50 jednotek thrombinu (což odpovídá 16,7 μ g enzymového proteinu) v 50 μ l stejného pufru. Po inkubaci po dobu 2 hodin při teplotě 37 °C se reakční roztok a vhodná zředovací látka zavádí do testu.

e) Kvantitativní důkaz komplexů thrombinu-antithrombin

Do depotů mikrotitračních destiček, které byly potaženy způsobem podle odstavce c) protilátkami prothrombinu a uspořádány pro test, se naplní 0,2 ml vzorku o známém obsahu thrombinu v komplexně vázané formě. Jako vzorky o známém obsahu se použijí fosfátem pufrované roztoky inkubační směsi získané podle odstavce d) s odstupňovaným zředěním. Pro stanovení nulové hodnoty se použijí některé depoty s 0,2 ml zředovacího prostředku bez komplexu enzym-inhibitor. Po dvouhodinové inkubaci při teplotě místnosti se obsah všech depotů odsaje a třikrát se promyjí fosfátem pufrovaným solným roztokem, který dodatečně obsahuje 0,05 % hmotnostních detergentu. Potom se depoty naplní 0,2 ml roztoku enzy-

mem značených protilátek antithrombinu III, vyrobených podle odstavce b). Roztok se předem nastaví na asi 300 jednotek/1 AP-aktivita. Jako zředovací činidlo se použije 10 mM pufru tris/kyselina chlorovodíková o pH 7,5, který dodatečně obsahuje ještě 2 mM chloridu hořečnatého, 0,025 mM chloridu zinečnatého, 1 % hmotnostní ovalbuminu, 1 mM natriumdodecylsulfátu a 0,02 % hmotnostních azidu sodného. Destičky se potom vzduchotěsně uzavřou a přes noc se inkubují při teplotě místnosti. Po inkubaci se kapalina odsaje, destičky se třikrát promyjí a krátce se vysuší na vzduchu. Potom se depoty naplní vždy 0,2 ml roztoku pufr-substrát pro AP-test. Po době inkubace 20 minut se reakční směs z depotů převede do mikrokvet a na fotometru se změří extinkce. Jako nulová hodnota slouží hodnota extinkce roztoku pufr-substrát.

V depotech, které obsahovaly komplexy proteolytického enzymu s inhibitorem proteázy, byly zjištěny zvýšené hodnoty extinkce. Pro vyhodnocení byly použity extinkce při 405 nm roztoku pufr-substrát z každého depotu po dvacetiminutové inkubaci ve srovnání s použitým vypočteným množstvím do komplexu vázaného thrombinu.

V následující tabulce jsou uvedeny konečné hodnoty extinkce při 405 nm po dvacetiminutové inkubaci v závislosti na množství antigenu.

TABULKA

thrombin (ng)	OD ₄₀₅ /20 minut
1270	0,400
635	0,390
318	0,321
159	0,279
79,5	0,196
39,8	0,137
19,9	0,099
10,0	0,058
5,0	0,025
0 — slepý pokus	0

Z výsledků uvedených v tabulce vyplývá, že mezi použitým množstvím antigenu a fotometricky změřenou enzymatickou indikátorovou reakcí je úzká souvislost, která umožňuje kvantitativní stanovení komplexů thrombinu a antithrombinu III.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob imunologického stanovení enzymů za pomoci protilátek stanovovaného enzymu, vázaných na ve vodě nerozpustný nosič, vyznačený tím, že se enzymy, které tvoří s inhibitorem komplex enzym-inhibitor, inkubují s vázanými protilátkami, reakční roztok se odstraní, promytý nosič s protilátkou, nasycený komplexem enzym-inhibitor, se nechá inkubovat s produktem kopulace, vytvořeným z protilátky specificky reagující s inhibitorem a ze značené substance, nenavázaný produkt kopulace se odstraní a míra určované koncentrace enzymu se zjistí na základě koncentrace značené substance na pevné fázi.

2. Prostředek k provádění způsobu podle bodů 1 až 3 vyznačený tím, že obsahuje re-

akční nádobu potaženou protilátkou stanovovaného enzymu a produkt kopulace, tvořený z protilátky specificky reagující s inhibitorem a značkovací substance.

3. Prostředek podle bodu 2 vyznačený tím, že obsahuje reakční nádobu potaženou protilátkou proteolytických enzymů a produkt kopulace, tvořený protilátkou specificky reagující s inhibitorem proteáz a značkovací substancí.

4. Prostředek podle bodů 2 a 3 vyznačený tím, že obsahuje reakční nádobu potaženou protilátkou elastázy leukocytů a produkt kopulace, tvořený protilátkou specificky reagující s alfa₁-antitrypsinem a značkovacím enzymem.