

ČESKOSLOVENSKÁ
SOCIALISTICKÁ
REPUBLIKA
(19)



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

252222

(11) (B1)

(51) Int. Cl.⁴

G 01 N 33/50

(22) Přihlášeno 15 07 85

(21) PV 5246-85

(40) Zveřejněno 15 01 87

(45) Vydáno 15 09 88

(75)

Autor vynálezu

KRAUZ VLADIMÍR ing., ZAVÁZAL VLADIMÍR doc. dr. DrSc., PLZEŇ

(54) Stanovení proteinů enzymimunologickou metodou

Stanovení proteinu, zejména imunoglobulinu E a ostatních sérových bílkovin enzymimunologickou metodou spočívá v tom, že do agarozové plotny s obsahem antiséra difunduje zkoušený vzorek s obsahem proteinů, přičemž identifikace radiálních precipitačních zón se provádí převrstvením agarozové plotny peroxidásovým konjugátem králičího antiséra proti prasečím bílkovinám, po inkubaci při teplotě místnosti ve vlhké komůrce po dobu 20 ± 2 h a po promytí gelu fosfátovým fyziologickým roztokem s tenzidem se opět agarozové plotny převrství při teplotě místnosti substrátovým roztokem peroxidu vodíku s chromogenem, který je nerozpustný ve vodě a je citlivý na změnu vodíkových iontů, barevně zvýrazněné zóny se proměří planimetricky.

Vynález se týká způsobu stanovení proteinů, zejména imunoglobulinu E a ostatních sérových bílkovin ve velmi nízkých koncentracích.

Dosud používané metody kvantitace imunoglobulinu E IgE jsou radioimunostanovení, enzymimunostanovení a imunonefelometrické metody. Všechny tyto metody jsou velmi citlivé a v principu založené na reakci antigen-protilátka.

Nevýhod těchto technik je však poměrně mnoho. Jedná se o práci s radioizotopy, což vyžaduje speciální laboratoř, drahé dovozové soupravy a přístroje. Toto částečně odstraňuje enzymimunostanovení, kde odpadá práce s izotopy, avšak neodstraňuje drahé soupravy a přístroje z dovozu. Robněž imunonefelometrické metody vyžadují nákladné přístroje a jsou náročné na čas, materiál a počet pracovníků. Známa enzymoimunologická stanovení sendvičovými testy na pevných nosičích vyžadují nákladné přístroje z dovozu a antiséra vysoké čistoty. Například při stanovení imunoglobulinu R by bylo nutno použít antisérum proti imunoglobulinu E, které je v potřebné vysoké čistotě a kojigované peroxidásou nedostupné.

Tyto nevýhody odstraňuje stanovení nízkých obsahů proteinů enzymoimunologickou metodou podle vynálezu, která spočívá v tom, že do agarozové plotny s obsahem antiséra difunduje zkoušený vzorek s obsahem proteinů, přičemž identifikace radiálních precipitačních zón se provádí převrstvením agarozové plotny peroxidázovým konjugátem králičího antiséra proti prasečím bílkovinám, po inkubaci při teplotě místnosti ve vlhké komůrce po dobu 20 ± 2 h a po promytí gelu fosfátovým fyziologickým roztokem s neionogenním tenzidem (Tweenem 20) se opět agarozová plotna převstří při teplotě místnosti substrátovým roztokem peroxidu vodíku s chromogenem, který je nerozpustný ve vodě a je citlivý na změnu vodíkových iontů, barevně zvýrazněné zóny se planimetricky proměří.

Výhodou tohoto způsobu je vysoká citlivost a specifita reakce. V případě kvantitace imunoglobulinu E lze stanovit koncentrace v rozmezí 30 až 20 000 KU ($1/72,6 \times 10^{-8}$ až $48,4 \times 10^{-5}$ g/ml). Metoda je schopna plně nahradit radioimunodifuzi a odstraňuje práci s izotopy. Rovněž nevyžaduje žádné přístroje. Cena jednoho vyšetření je 20 až 30krát nižší než u dovozových souprav. Oproti imunologickým metodám sendvičového typu přináší výhodu dostupného přístrojového vybavení, neboť velikost zón se proměří pouze planimetrocky. Při této metodě není nutno používat těžko dostupná antiséra konjugovaná s peroxidásou vůči zkoušeným lidským proteinům neboť králičí protilátka, která je snadno dostupná, působí vůči první prasečí protilátce.

Způsob stanovení podle vynálezu je blíže osvětlen v následujícím příkladu.

P ř í k l a d

V první fázi se do agarozového gelu inkorporuje prasečí protilátka proti lidskému imunoglobulinu E ve vysokém ředění /500 až 1 000krát podle čistoty preparátu/. K naředění antiséra a k přípravě gelu se používá 0,03M fosfátový pufr a 2 % citronanu sodného, pH 8,0. Po nanesení vzorků /standards a lidské sérum/ se gel inkubuje 24 hodin při teplotě místnosti. Následuje intenzivní promývání ve fosfát-fyziologickém roztoku s přídavkem 0,05 % hmotnostního tenzidu (Tweenu 20) pH 7,4 /PBS-T/ po dobu 72 hodin. Vypraný agarozový gel se pak inkubuje v roztoku peroxidázového konjugátu protilátky proti první protilátce králičího antiséra proti prasečím bílkovinám. Roztok se připravuje v tisícinásobném ředění uvedeného antiséra v PBS-T s přídavkem 1 % hovězího sérového albuminu. Roztok může být zaměněn i pouhým přiložením filtračního papíru Whatman 1 napuštěného roztokem konjugátu. Inkubace probíhá ve vlhkém prostředí 20 hodin při 4 °C /nebo 10 hodin při 20 °C/. Po ukončení inkubace se gel intenzivně pere v PBS-T 72 hodiny.

Po odstranění pracovního roztoku z gelu se agarozová plotna převrství substrátovým roztokem při teplotě místnosti a po objevení precipitačních prstenců se reakce zastaví roztokem azidu sodného /0,1 % hmot./, popřípadě vysušením. Může se použít několika druhů substrátových roztoků peroxidu vodíku s chromogenem:

1. 50 mg o-diaminobenzidinu se rozpustí ve 200 ml 0,1M Tris-HCl pufru pH 7,6 a přidá se 670 μ l 3 % H_2O_2 .
2. 30 mg 3-amino-9-etylkarbazol se rozpustí v 10 ml dimetylformamidu /DMR, Reachim/ ev. ve 2 ml acetonu, přidá se 40 ml 5mM acetátového pufru pH 5,0 a 200 μ l 3 % čerstvého roztoku H_2O_2
3. 30 mg 4-chlor-1-naftol /Fluka/ v 50 ml 50 mM Tris-HCl s 200 mM NaCl, pH 7,4 a přidá se 170 μ l 3 % H_2O_2 .

Zóny se vybarví během 5 až 10 minut. Podle průměru nebo podle plochy zbarveného prstence a porovnáním se standardem se stanoví obsah sérových bílkovin.

Uvedené metody je možno využít při stanovení imunoglobulinu E u alergiků, defektů v imunitě, parazitárních chorob a defektních imunoglobulinů G, A, H, D, při stanovení nízkých hladin všech nádorových, zánětlivých i dalších bílkovin.

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

Stanovení proteinů enzymimunologickou metodou, vyznačující se tím, že do agarozové plotny s obsahem antiséra difunduje zkoušený vzorek s obsahem proteinů, přičemž identifikace radiálních precipitačních zón se provádí převrstvením agarozové plotny peroxidásovým kójugátem králičího antiséra proti prasečím bílkovinám, po inkubaci při teplotě místnosti ve vlhké komůrce po dobu 20 ± 2 h a po promytí gelu fosfátovým fyziologickým roztokem s přídatkem 0,05 % hmot. neinogenního tenzidu se opět agarozová plotna převrství při teplotě místnosti substrátovým roztokem peroxidu vodíku s chromogenem, nerozpustným ve vodě a citlivým na změnu vodíkových iontů, přičemž barevně zvýrazněné zóny se proměří planimetricky.