



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

261783

(11)

(B1)

(51) Int. Cl.⁴

G 01 N 23/00

(22) Přihlášeno 18 11 86
(21) PV 8368-86.K

(40) Zveřejněno 15 07 88

(45) Vydáno 15 06 89.

(75)

Autor vynálezu

MAREK MIROSLAV doc. ing. CSc., RAUCH PAVEL ing. CSc., PRAHA,
GALOCI JÁN RNDr., MATĚJKA PETR ing., MACHÁN VLADIMÍR ing., KOŠICE

(54) Způsob radioimunochemického stanovení lidského choriového gonadotropinu

Způsob radioimunochemického stanovení lidského choriového gonadotropinu spočívá v tom, že se na protilátku proti lidskému choriovému gonadotropinu, imobilizovanou na aktivované porézní sklo o velikosti částic 3 až 30 μm , působí roztokem radioizotopem značeného choriového gonadotropinu, například ^{125}I , v objemovém poměru 2 až 3:1 k imobilizované protilátce a analyzovaný vzorek krevního séra nebo moči v obj. poměru 1:2 až 3 k inkubační směsi, obsahující imobilizovanou protilátku, radioizotopem značený choriový gonadotropin a analyzovaný vzorek, přičemž se po 0,5 až 2 hodinách inkubace na nosiči vytvořený imunochemický komplex dostředí a z jeho změněné radioaktivity se určí obsah lidského choriového gonadotropinu v analyzovaném vzorku.

Vynález se týká způsobu radioimunochemického stanovení lidského choriového gonadotropinu /HCG/.

Stanovení choriového gonadotropinu má velký význam pro průkaz těhotenství v jeho počátečním stadiu. Jeho syntéza nastává již v nejranější fázi vývoje placenty a tak se brzy tento hormon objeví v krevní plazmě, respektive v moči těhotné ženy. Vzhledem k tomu, že je pomalu katabolizován, přetrvává jeho výskyt v organismu řadu dní. Toto skutečnosti využívaly dřívější metody průkazu gravidity žen, založené na průkazu choriového gonadotropinu pomocí biologických testů.

V poslední době se objevily možnosti průkazu, resp. stanovení choriového gonadotropinu pomocí imunochemických technik. Vedle orientačních aglutinačních testů je to zvláště radioimuno stanovení /RIA/ založené na poměrné saturaci protilátky proti choriovému gonadotropinu tímto antigenem obsaženým v analyzovaném vzorku a antigenem značený například ^{125}I . Tato imunochemická metoda umožňuje stanovit choriový gonadotropin v rozmezí 0 až 800 jednotek/l. Důležitým krokem tohoto stanovení je separace volného a vázaného hormonu na protilátku. Při klasickém postupu se tohoto oddělení dosahuje obvykle některou precipitační technikou, nejčastěji metodou druhé protilátky. Vzhledem k tomu, že vazba choriového gonadotropinu na specifickou protilátku je reverzibilní povahy, je u uvedených separací nebezpečí porušení rovnováhy mezi volným a vázaným HCG. Značného zjednodušení a výrazné zrychlení celého postupu analýzy je možno dosáhnout imobilizací protilátky na vhodný nosič.

K imobilizaci specifické protilátky proti HCG se v poslední době začaly používat syntetické polymery, na které se protilátka imobilizuje kovalentní vazbou. Při použití těchto nosičů je však třeba inkubační směs během saturace třepat nebo míchat.

Tuto nevýhodu, která pro svoji experimentální náročnost snižuje přednosti použití imobilizované protilátky, odstraňuje způsobu radioimunochemického stanovení choriového gonadotropinu dle vynálezu spočívající v imobilizaci specifické protilátky proti choriovému gonadotropinu na porézní sklo o velikosti částic 3 až 30 μm s povrchem nebo chloridu titanitého s jeho následnou hydrolyzou na povrchu nosiče. k vytvořenému konjugátu specifické protilátky imobilizované na skleněný nosič se přidá roztok radioizotopem značeného choriového gonadotropinu, například ^{125}I , v obj. poměru 2 až 3:1 k imobilizované protilátce a analyzovaný vzorek krevního séra nebo moči v obj. poměru 2:1 až 3 k inkubační směsi, sestávající z imobilizované specifické protilátky, radioizotopem značeného choriového gonadotropinu a analyzovaného vzorku. Roztok radioizotopem značeného choriového gonadotropinu je možno barvit saturovanou červení LG 200 % v koncentraci max. 45 ml/l ředícího pufru a suspenzi s imobilizovanou protilátkou lze obarvit saturovanou modří L4G 300 % v koncentraci max. 15 mg/l pufru. S ohledem na způsob imobilizace protilátky a strukturu použitého nosiče se způsobem podle vynálezu dosáhne rovnováhy imunochemické interakce za 0,5 až 2 h při 20 °C, přičemž sedimentační rychlost použitého nosiče je natolik malá, že není nutno inkubační směs míchat či třepat. Po uvedené době se nosič s imobilizovanou protilátkou a na ní imunochemickou interakcí navázaným hormonem odstředí a na základě změřené radioaktivity se stanoví obsah choriogonadotropního hormonu v analyzovaném vzorku krevního séra, respektive moči.

Výhodou způsobu stanovení choriogonadotropního hormonu podle vynálezu je především výrazné zkrácení inkubační doby a celkové zjednodušení celého postupu. Toto zkrácení má velký význam s ohledem na potřebnou rychlost určení hodnoty obsahu tohoto hormonu zejména při screeningovém vyšetření žen, kdy lze určit gravidní ženy do jedné hodiny. K dalším výhodám způsobu dle vynálezu patří zmenšený počet lahvíček obsažených v soupravě pro stanovení a z toho plynoucí i menší počet pipetovacích kroků, odstranění nutnosti používání termostatu a zkrácení doby centrifugace, případně i používaného počtu otáček centrifugy. Způsob podle vynálezu sníží počet pipetovacích kroků a barevné značení přidávaných komponent. umožňuje vizuální kontrolu celého analytického postupu.

Vynález je dokumentován příklady, aniž by se jimi omezoval.

P ř í k l a d 1

K jednomu hmotnostnímu dílu porézního skla o velikosti částic 3 až 30 μm se přidá 10 hmotnostních dílů 20 % hmot. roztoku gamma-aminopropyltriethoxysilanu v toluenu a zahřívá se pod zpětným chladičem. Po 24 h se sklo promyje toluenem. Po vysušení se k 1 hmotnostnímu dílu modifikovaného skla přidá 10 objemových dílů 5 % hmot. glutaraldehydu a směs se třepe při 37 °C. Poté se aktivované sklo promyje na fritě 0,05 M fosfátovým pufrům pH 7,5. K jednomu hmotnostnímu dílu vláhkého aktivovaného nosiče se přidá 2,5 objemových dílů specifické protilátky proti choriovému gonadotropinu. Ke 100 μl suspenze této specifické protilátky zředěné 0,05 M fosfátovým pufrům pH 7,5 v poměru 1:100 se přidá 100 μl ^{125}I značeného hormonu a 100 μl analyzovaného vzorku krevního séra či moči. Inkubační směs se ponechá 2 h při laboratorní teplotě 20 °C a poté se odstředí 10 minut 3 000 ot/min. Po odsátí supernatantu se změří radioaktivita sedimentu. Takto lze stanovit tento hormon v požadovaném koncentračním rozsahu 0 až 800 IU/l s variačním koeficientem stanovení do 5 %.

P ř í k l a d 2

Ke 100 μl suspenze imobilizované protilátky připravené shodným postupem pH 7,5 v poměru 1:15 se přidá 100 μl ^{125}I značeného hormonu a 100 μl analyzovaného krevního séra nebo moči. Dalším postupem shodným jako v příkladu 1, při úpravě inkubační doby na 30 minut, je možno screeningově určit graviditu žen, jejichž moč je testována.

P ř í k l a d 3

Jeden hmotnostní díl porézního skla o velikosti částic 3 až 30 μm se přidá k 10 dílům 12,5 % hmot. chloridu titanitého v koncentrované kyselině chlorovodíkové a nechá se 20 minut třepat při 40 °C. Pak se odsaje a suší při 45 °C po dobu 6 h v termostatu. Usušené aktivované sklo se 6krát promyje vždy 20 hmotnostními díly vody a nakonec se usuší při 45 °C. Imobilizace specifické protilátky na takto připravený nosič se provede shodným postupem jako v příkladu 1. Dalším postupem, shodným jako v příkladu 1, lze stanovit koncentraci hormonu v analyzovaných vzorcích v koncentračním rozsahu 0 až 80 IU/l.

P ř í k l a d 4

Choriogonadotropní hormon se stanoví shodným postupem jako v příkladu 1 až 3 s tím, že se z důvodu zlepšení vizuální kontroly pipetování obarví roztok radioizotopem značeného hormonu saturevanou červení LG 200 % /45 mg/l ředícího pufru/ a suspenze s imobilizovanou protilátkou saturevanou modří L4G 300 % /15 mg/l pufru/.

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

1. Způsob radioimunochemického stanovení lidského choriového gonadotropinu vyznačující se tím, že se na protilátku proti lidskému choriovému gonadotropinu imobilizovanou na aktivované porézní sklo o velikosti částic 3 až 30 μm působí roztokem radioizotopem značeného choriového gonadotropinu, například ^{125}I , v obj. poměru 2 až 3:1 k imobilizované protilátce a analyzovaný vzorek krevního séra nebo moči v obj. poměru 1:2 až 3 k inkubační směsi, obsahující imobilizovanou protilátku, radioizotopem značený choriový gonadotropin a analyzovaný vzorek, přičemž se po 0,5 až 2 hodinách inkubace na nosiči vytvořený imunochemický komplex odstředí a z jeho změřené radioaktivity se určí obsah lidského choriového gonadotropinu v analyzovaném vzorku.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se protilátka proti lidskému choriovému gonadotropinu imobilizuje na povrch porézního skla aktivovaného reakcí s roztokem 5 až 50 % hmot. gamma-aminopropyltriethoxysilanu a následným působením roztoku 5 až 15 % hmot. glutaraldehydu.

3. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se protilátka proti lidskému chorióvému gonadotropinu imobilizuje na povrch porézního skla aktivovaného roztokem 10 až 20 % hmot. chloridu tranzitního kovu, například chloridu titanitého, s následnou hydrolyzou vodou těchto solí na povrchu nosiče.

4. Způsob podle bodů 1 až 3, vyznačující se tím, že se roztok radioizotopem značeného chorióvého gonadotropinu obarví saturevanou červení LG 200 % v koncentraci 30 až 60 mg/l ředícího pufru a suspenze s imobilizovanou protilátkou se obarví saturevanou modří L4G 300 % v koncentraci 10 až 20 mg/l ředícího pufru.