

Technika radioimmunologicznego oznaczania poziomu hormonów (RIA)

dr Katarzyna Knapczyk-Stwora

Warunki wstępne:

Proszę zapoznać się z tematem „Radioimmunologiczne metody oznaczania hormonów steroidowych” zamieszczonym w skrypcie pod reakcją A. Lityńskiej i M. Lewandowskiego „Techniki badań fizjologicznych”, Wydawnictwo UJ, 1998 (skan w załączeniu)

Wstęp:

Metody radioimmunologiczne (RIA) są bardzo czułe i precyzyjne, dzięki temu znalazły zastosowanie przy oznaczaniu hormonów lub innych substancji, które można znakować i przeciw którym można indukować odpowiednie przeciwciała (tj. substancje białkowe, enzymy, glikozydy, metabolity pleśni oraz narkotyki). Powszechnie stosowanymi znacznikami w tych metodach są tryt (^3H) emitujący promieniowanie β lub radioaktywny jod (^{125}I) emitujący promieniowanie γ . Hormony steroidowe krążą we krwi i są uwalniane w warunkach fizjologicznych w ilościach nano- i pikogramowych, stąd oznaczenie tak małych ilości stało się możliwe dopiero dzięki opracowaniu metod radioimmunologicznych.

Zasada metody RIA oparta jest na współzawodnictwie znakowanych i nieznakowanych form tego samego steroidu o ograniczoną ilość miejsc wiązania na cząsteczkach swoistych przeciwciał. Jeżeli odpowiednio rozcieńczone przeciwciało (Ab) zmieszamy ze steroidem znakowanym trytem ($^3\text{H-S}$) – nazywanym „steroidem gorącym”, wówczas powstanie odpowiedni kompleks ($^3\text{H-S-Ab}$). Gdy do tego kompleksu dodamy nieznakowanego steroidu (S) – tzw. „zimnego steroidu”, to jego cząsteczki będą współzawodniczyły z „gorącym steroidem” o miejsce wiązania na przeciwciele. Między ilością dodanego steroidu a ilością kompleksów radioaktywnych $^3\text{H-S-Ab}$ istnieje zależność odwrotnie proporcjonalna. Czyli im więcej w badanej próbce oznaczanego „zimnego steroidu”, tym mniej utworzy się kompleksów $^3\text{H-S-Ab}$, a co za tym idzie, tym mniejsza radioaktywność badanej próbki. Pomiaru radioaktywności oznaczanych próbek dokonuje się w liczniku scyntylacyjnym. Stężenie badanego steroidu w badanej próbce odczytuje się z krzywej wzorcowej na podstawie radioaktywności tej próbki. Krzywą wzorcową wykreśla się mierząc radioaktywność znanej ilości „zimnego steroidu” – naniesić na osi X znane ilości (5, 10, 20, 50, 100, 200 pg lub ng) oznaczanego, nieradioaktywnego wzorca steroidu, a na osi Y radioaktywność takiej próbki po dodaniu „gorącego steroidu” wyrażoną w ilości impulsów radioaktywnych na minutę (cpm – counts per minute).

Opis procedury:

W trakcie ćwiczeń studenci pracują w dwóch grupach zgodnie z przygotowanym protokołem, z których każda wykonuje oznaczenie ilości estradiolu lub androgenów w pożywkach z hodowli komórek ziarnistych świnii hodowanych z dodatkiem różnych czynników wpływających na poziom steroidogenezy w tych komórkach. Poniżej podano przykład procedury oznaczania poziomu estradiolu metodą RIA. Przy oznaczaniu poziomu androgenów będziemy postępować w analogiczny sposób:

1. Przygotowanie krzywej wzorcowej w oznaczaniu estradiolu:

Zgodnie z protokołem RIA należy odmierzyć do odpowiednich probówek (od numeru 7 do 18) po 5 μ l, 10 μ l, 20 μ l, 50 μ l, 100 μ l oraz 200 μ l standardu oznaczanego hormonu (estradiolu) rozpuszczonego w alkoholu etylowym. Objętość ta odpowiada kolejno 5 pg, 10 pg, 20 pg, 50 pg, 100 pg oraz 200 pg estradiolu. Każdy punkt krzywej wzorcowej wyznaczamy podwójnie.

Po odmierzeniu standardu hormonu należy odparować alkohol na łaźni wodnej w temp. 42°C, a następnie po wysuszeniu probówek ze standardem oznaczanego steroidu dodać do każdej z nich po 200 μ l pożywki Eagle'a. Do probówek nr 19 i 20 odmierzamy po 200 μ l pożywki Eagle'a – będą to próbki ślepe.

2. Przygotowanie próbek do oznaczenia:

Próbki rozmrażamy bezpośrednio przed oznaczeniem. Zgodnie z protokołem RIA pobieramy odpowiednią objętość próbki do kolejnych probówek (od numeru 20 do 100). Każdą próbkę biologiczną oznaczamy podwójnie.

Po zakończeniu odmierzania próbek uzupełniamy je pożywką Eagle'a do objętości 200 μ l.

3. Do wszystkich próbek (poza próbką T i N – probówki nr 1-4) odmierzamy po 100 μ l przeciwciała. Następnie próbki wytrząsamy i zostawiamy na 30 min. W tym czasie studenci opracowują wyniki otrzymane z licznika scyntylicyjnego.

4. Do wszystkich próbek odmierzamy po 100 μ l „gorącego” estradiolu i przenosimy próbki do chłodni.

Radioaktywność próbek mierzy się po całonocnej inkubacji i oddzieleniu frakcji wolnej hormonów od związanej z przeciwciałami przez dodanie do każdej próbki zawiesiny węgla aktywnego z dekstranem w PBS i ich zwirowanie. Frakcje związane z przeciwciałem z poszczególnych próbek (nadsącz) pipetuje się do naczynek scyntylicyjnych, dodaje scyntylatora i mierzy ich radioaktywność w liczniku scyntylicyjnym

Wymagania:

Student powinien wiedzieć na czym polega zasada oznaczania poziomu hormonów steroidowych metodą radioimmunologiczną, na jakim materiale biologicznym można ją stosować, jak przygotować taki materiał do badania (odmierzenie konkretnej objętości próbki, ekstrakcja hormonów steroidowych, przygotowanie przeciwciał). Student powinien znać pojęcie błędów wewnątrzseryjnych i międzyseryjnych, rodzaje promieniowania jonizującego, pojęcia dotyczące promieniowania jonizującego tj. dawka pochłonięta, moc dawki, metody wykrywania promieniowania jonizującego oraz zasadę działania licznika scyntylicyjnego.

Student powinien potrafić samodzielnie przygotować i przeprowadzić oznaczenie poziomu steroidów metodą RIA w pożywkach z hodowli komórkowej w oparciu o przygotowany przez prowadzącego protokół, wykreślić krzywą wzorcową i odczytać poziom hormonów steroidowych w badanym materiale oraz interpretować wyniki.

Student powinien rozumieć konieczność odpowiedniego zaplanowania eksperymentu, precyzyjnego odmierzenia próbek w badaniach ilościowych oraz zachowanie zasad bezpiecznego wykonywania doświadczeń.

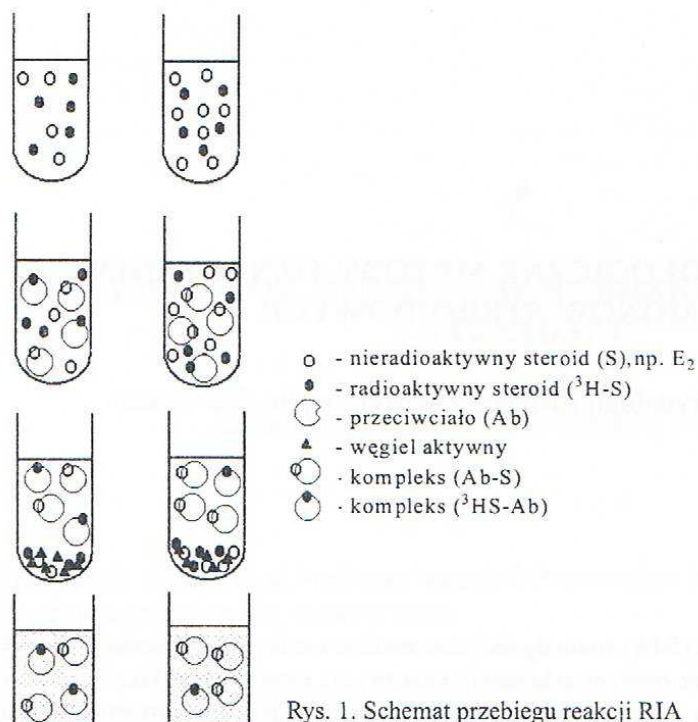
RADIOIMMUNOLOGICZNE METODY OZNACZANIA HORMONÓW STEROIDOWYCH

Pracownia Endokrynologii Zwierząt Zakładu Fizjologii Zwierząt

Wstęp

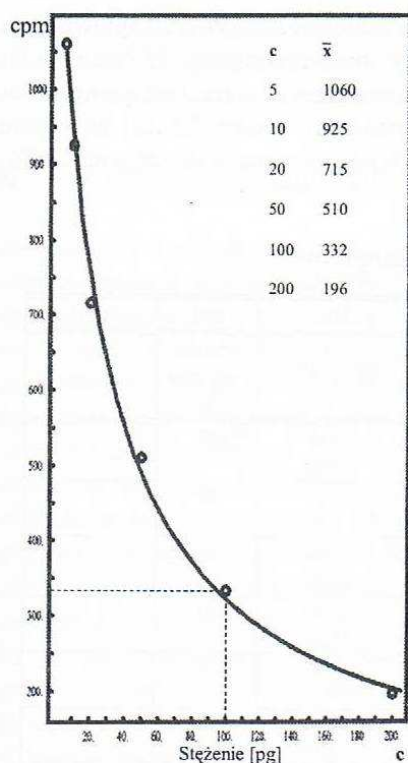
Metody radioimmunologiczne (RIA) znalazły szerokie zastosowanie przy oznaczaniu nie tylko hormonów steroidowych, ale różnych substancji białkowych, enzymów, glikozydów, a nawet toksycznych metabolitów pleśni, powszechnie występujących w naszym środowisku, a wykazujących działanie hepatotoksyczne, teratogenne, karcynogenne i mutagenne. Hormony steroidowe krążą we krwi i są uwalniane w warunkach fizjologicznych w ilościach nano- i pikogramowych. Najbardziej odpowiednimi i czułymi metodami do ich oznaczania są metody RIA, służące do ilościowego oznaczania hormonów lub innych substancji, które można znakować i przeciw którym można indukować przeciwciała. Najbardziej znanymi znacznikami używanymi w tych metodach są tryt (^3H) emitujący promieniowanie β lub radioaktywny jod (^{125}I) emitujący promieniowanie γ . Radioimmunologiczna metoda oznaczania hormonów steroidowych została opisana przez Abrahama, Hotchkiss, Dufau w latach siedemdziesiątych. Czynnikiem wiążącym steroidy są tu swoiste przeciwciała (Ab). Zasada metody jest oparta na współzawodnictwie znakowanych i nieznakowanych form tego samego steroidu o ograniczoną ilość miejsc wiązania na cząsteczkach swoistych przeciwciał. Jeżeli odpowiednio rozcieńczone przeciwciało (Ab) zmieszamy ze steroidem znakowanym trytem $^3\text{H-S}$ (tzw. gorący hormon), wówczas powstanie kompleks $^3\text{H-S-Ab}$. Gdy do tego kompleksu dodamy nieznakowanego steroidu S (tzw. zimnego steroidu), to jego cząsteczki będą współzawodniczyły ze znakowanymi trytem cząsteczkami „gorącego steroidu” o miejsce wiązania z Ab.

$^3\text{H-S} + \text{Ab} \rightleftharpoons ^3\text{H-S-Ab}$ $+$ S $\uparrow\downarrow$ S-Ab	Im więcej doda się S, tym więcej hormonu znakowanego $^3\text{H-S}$ zwolni miejsca wiążące i tym mniej utworzy się kompleksów $^3\text{H-S-Ab}$. Frakcję wolną steroidów, czyli nie związaną z przeciwciałem (S, $^3\text{H-S}$), oddziela się od frakcji związanej (S-Ab i $^3\text{H-S-Ab}$) przez dodanie zawiesiny węgla aktywnego zmieszanego z dekstranem, adsorbującego silnie cząsteczki frakcji wolnej („gorącego”, jak i „zimnego” steroidu). Schemat przebiegu reakcji przedstawia rysunek 1 (s. 44). Po odwirowaniu frakcję steroidów związanych z Ab ($^3\text{H-S-Ab}$, S-Ab) obecną w nadsą- czu odpipetowujemy do naczynek scyntylacyjnych i mierzymy jej radioaktywność w licznikach scyntylacyjnych. W rezultacie mierzymy radioaktywność kompleksów $^3\text{H-S-Ab}$. Między
---	---



Rys. 1. Schemat przebiegu reakcji RIA

ilością dodanego S a ilością radioaktywnych kompleksów 3H -S-Ab istnieje zależność odwrotnie proporcjonalna. Dodając znane ilości S i mierząc radioaktywność frakcji związanej 3H -S-Ab, można wykreślić krzywą wzorcową, nanosząc na osi X znane ilości (np. 5, 10, 20, 50, 100, 200 pg) oznaczanego, nieradioaktywnego wzorca steroidu S, a na osi Y – radioaktywność frakcji związanej z Ab (3H -S-Ab), wyrażoną w ilości impulsów radioaktywnych na minutę (cpm – *counts per minute*) (rys. 2). Ilość hormonu w oznaczanej próbce wyliczamy z krzywej standardowej na podstawie radioaktywności frakcji związanej tej próbki. Rozcieńczenie użytych przeciwciał wyznaczamy doświadczalnie, badając procent wiązania określonej ilości znakowanego hormonu steroidowego. Do oznaczeń używamy takiego rozcieńczenia Ab, przy którym wiązanie znakowanego hormonu wynosi 50%. Wysoka specyficzność Ab charakteryzuje się niską zdolnością wchodzenia w reakcje krzyżowe. Wysoko specyficzne Ab wykazują zdolność do łączenia się tylko z tymi antygenami, które mają stereochemiczną strukturę dokładnie „pasującą” do miejsc wiązania z Ab, nawet przy obecności dużego nadmiaru podobnych substancji. Hormony steroidowe nie są immunogenami, zawierają grupy hydroksylowe lub ketonowe, które przed sprzęgnięciem z nośnikiem (np. białkiem albuminą – BSA) muszą być przeprowadzone w odpowiednie pochodne zawierające wolny karboksyl lub aminę. Najczęstszymi rodzajami pochodnych są bursztyniany i CMO-pochodne (w wyniku kondensacji grupy ketonowej haptenu – steroidu z karboksy-metoksy-O-hydroksylaminą). Przeciwciała te uzyskujemy najczęściej przez immunizowanie królików, kóz, owiec. W metodach RIA stosujemy surowicę tych zwierząt zawierającą indukowane przeciwciała, a także wysoko specyficzne przeciwciała monoklonalne. Izotopy rozcieńczamy w ten sposób, by dodana ilość do każdej próbki dawała w przybliżeniu radioaktywność 25 000 impulsów/min, przy wydajności licznika scyntylacyjnego około 60%.



Rys. 2. Krzywa standardowa estradiolu (E_2) wykreślona na podstawie protokołu oznaczenia (tab. 1)

8.1. Wykonanie ćwiczenia

8.1.1. Przygotowanie krzywej wzorcowej w oznaczaniu estradiolu (E_2)

Próbki wyznaczające krzywą wzorcową zawierają 5, 10, 20, 50, 100, 200 pg E_2 , rozpuszczonego w alkoholu etylowym. Każdy punkt krzywej wzorcowej wyznaczamy podwójnie, a nawet potrójnie. Po odparowaniu alkoholu na łaźni wodnej w temperaturze 42°C , do każdej z nich dodajemy 200 μl pożywki Eagle'a.

8.1.2. Przygotowanie próbek do oznaczania

Próbki (A, B, C, D, E....Z) (tab. 1) rozmrażamy bezpośrednio przed oznaczeniem. Do oznaczeń pobieramy np. 100 μl i uzupełniamy do 200 μl medium Eagle'a. Każdą próbkę biologiczną oznaczamy podwójnie. Bardzo często przed oznaczaniem badane próbki poddaje się ekstrakcji. Dotyczy to przede wszystkim surowicy lub homogenatów. Rozpuszczalnikami organicznymi używanymi do ekstrakcji są: eter naftowy, etylowy lub n-heksan.

Przy oznaczaniu estradiolu zawartego w homogenatach tkanek pobieramy do probówek ze szlifem po 200 μl homogenatu i następnie ekstrahujemy eterem etylowym (2.5 ml). Probki wytrząsamy przez 5 minut i wirujemy przez 10 minut przy g równym 700, a następnie kładziemy na suchym lodzie lub pozostawiamy w temperaturze -20°C przez 1 godzinę. Frakcja wodna zamraża, a płynną frakcję eterową nadsącza, zawierającą wyekstrahowany estradiol, zlewamy do

próbówek i odparowujemy eter na łaźni wodnej w temperaturze 42°C. W celu sprawdzenia jakości ekstrakcji steroidów wykonuje się odzysk „zimny” nieradioaktywny. W tym celu do próbek ze szlifem odmierzymy np. 100 pg standardu E₂ oznaczanego nieradioaktywnego steroidu, dolewamy 200 µl czystej pożywki lub buforu i uzupełniamy eterem (2.5 ml). Następnie wytrząsamy jak pozostałe nieznane próbki. Wartość tego odzysku powinna wynosić ponad 90%.

Tabela 1
Przykład protokołu oznaczenia RIA

I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Nr próbki	S	Ab po 100 µl	³ H-S po 100 µl	C po 1 ml	cpm/min	średnie cpm/min $\bar{X}$	c w pg
1	T		³ H-S ↓	tylko 1 ml buforu	2500	2490	
2					2480		
3	N			C ↓	40	41	
4					42		
5	0 pg	Ab ↓			1250	1240	
6					1230		
7	5 pg				1020	1060	
8					1100		
9	10 pg				900	925	
10					950		
11	20 pg				700	715	
12					730		
13	50 pg				500	495	
14					490		
15	100 pg				340	332	
16					324		
17	200 pg				202	196	
18					190		
19	ślepa				1200	1240	0.00
20					1280		
21	stała pożywka 20 pg				740	720	19.24
22					680		
23	A				1100	1095	3.73
24					1090		
25	B				300	307	107.23
26					313		
27	C				700	720	22.11
28					740		
29	D				100	115	7489
30					130		
31	E				500	?	723.71
32					900		
51	stała pożywka 100 pg				350	340	98.92
52					330		
99	Z				1260	1240	0.00
100					1220		

Ślepe próby przygotowujemy z czystej pożywki (medium Eagle'a) używanej do hodowli tkankowych lub buforu fosforanowego (PBS) do homogenatów. Ślepe próby nie powinny przekraczać 10% zakresu krzywej wzorcowej.

8.1.3. Przebieg oznaczania (tab. 1)

Do wszystkich próbek odmierzymy po 100 μ l Ab, a po upływie 30 minut dodajemy po 100 μ l znakowanego trytem steroidu (3 H-S). Próbkę przenosimy do chłodni lub ustawiamy na łaźni lodowej i dalsze etapy oznaczenia wykonujemy w temperaturze 2–4°C. Czas inkubacji w niskiej temperaturze wynosi kilka godzin. Po ustaleniu się równowagi reakcji wiązania hormonów z przeciwciałem, oddziela się frakcję wolną od związanej przez dodanie do każdej próbki zawiesiny węgla aktywnego z dekstranem w PBS. Do każdej serii próbek przewidzianych do oznaczenia dołączamy po 2 próbki T i 2 próbki N. W oparciu o próbki T (*total*) ustalamy całkowitą radioaktywność 100 μ l dodanego znakowanego trytem steroidu, np. (3 H-E₂). Do tych próbek nie dodajemy roztworu Ab ani zawiesiny węgla aktywnego i dekstranu, tylko uzupełniamy roztworem 1100 μ l buforu. Natomiast N (*non specific bound*) określa radioaktywność znakowanych cząsteczek steroidu nie zaadsorbowanych przez mieszaninę węgla aktywnego z dekstranem. Do tych próbek zamiast roztworu przeciwciała dodajemy po 100 μ l PBS. Wszystkie próbki wytrząsamy i po krótkiej, 15-minutowej inkubacji z zawiesiną węgla wirujemy przez 10 minut przy 800 g. Frakcje związane z Ab (nadsącz) z poszczególnych próbek pipetujemy się do kolejnych naczynek scyntylacyjnych i dodaje scyntylatora. Przy oznaczeniach radioimmunologicznych hormonów steroidowych najczęściej używanym płynem scyntylacyjnym jest mieszanina toluenowa: PPO (2,5-diphenylooxazole) i POPOP-u (2,2'-p-phenyl-bis (5'-phenylooxazole)-benzene). W przeciwieństwie do innych technik (np. Geigera) mierzenia promieniowania metodą płynnej scyntylacji, detektor i próbka są zmieszane w jednym roztworze. Z wydruku impulsów (tab. I VI) zmierzonych w liczniku scyntylacyjnym wykreślamy krzywą wzorcową (rys. 2), z której odczytuje się ilość hormonów steroidowych w badanych próbkach, odejmując wartości ślepych prób i uwzględniając odzysk (tab. I VIII).

Precyzję krzywych wzorcowych i oznaczeń prób biologicznych wyznaczają błędy międzyzeryjne i wewnątrzeryjne: błędy międzyzeryjne wyrażone w postaci współczynników zmienności oblicza się dla poszczególnych punktów z 10 krzywych wzorcowych. Błędy międzyzeryjne wynikają z różnic pomiędzy wielokrotnymi oznaczeniami tych samych próbek w różnych seriach. Wielkości błędów wewnątrzeryjnych, czyli błędów wynikających z różnic pomiędzy dwu- lub wielokrotnymi oznaczeniami tej samej próbki (stałej pożywki) w jednej serii pomiarów, nie powinny przekraczać 10%. Do przygotowania tzw. stałych pożywek używamy tego samego zbuforowanego płynu fizjologicznego, który jest pożywką stosowaną w hodowlach tkanek. Do każdej z czterech pożywek dodajemy różne ilości nieradioaktywnego standardowego hormonu steroidowego, np. 20, 50, 100, 180 pg. Próbkę odpipetowujemy z tej samej porcji pożywki, mierzymy zawartość hormonu steroidowego w różnych seriach i obliczamy średnią i błąd międzyzeryjny. Stosujemy „stałe” pożywki odczytywane w różnych przedziałach krzywej wzorcowej.

Wszystkie odczynniki używane do oznaczeń RIA muszą być preparatami o wysokim stopniu czystości cz.d.a. Eter, n-heksan, etanol absolutny destylujemy przed użyciem. Zawiesinę węgla aktywnego i dekstranu przygotowujemy do każdego oznaczenia RIA.

8.1.4. Kontrola jakości oznaczeń

8.1.4.1. Miarą specyficzności przeciwciał są reakcje krzyżowe z podobnymi do oznaczanego steroidami.

8.1.4.2. Czułość testu określana jest jako najniższa, pewna i powtarzalna ilość oznaczanego steroidu, np. dla E_2 5 pg.

8.1.4.3. Powtarzalność wyników sprawdzamy, oznaczając w każdym teście tę samą tzw. stałą pożywkę.

Oznaczenie powtarzamy, jeśli różnica w wynikach przekracza 10%.

L i t e r a t u r a

Abraham E.G., Swierdleff R., Tulchinsky D. and Odell W.D.: *Radioimmunoassay of plasma progesterone*, J. Clin. Endocrinol. 32 (1971), s. 619–624.

Abraham E.G.: *Reliability criteria for steroid radioimmunoassay*, Path. Biol. 23 (1975), s. 885–888.

Dufau M.L., Catt L.J., Tsuruhara T. and Ryan D.: *Radioimmunoassay of plasma testosterone*, Clin. Chim. Acta 37 (1972), s. 403–409.

Hotchkiss J., Atkison L.E. and Knobil E.: *Time course of serum estrogen and luteinizing hormone (LH) concentration during the menstrual cycle of the rhesus monkey*, Endocrinology 89 (1971), s. 177–183.

Kokot F., Stupnicki R. (red.): *Metody radioimmunologiczne i radiokompetycyjne stosowane w klinice*, PZWL, Warszawa 1985.

Słowniczek skrótów

Ab – przeciwciało

S – standard nieradioaktywny oznaczanego steroidu („zimnego” hormonu), np. estradiolu (E_2)

Ab-S – frakcja zimnego steroidu związana z przeciwciałem

3H -S – steroid znakowany trytem („gorący” hormon – izotop), np. 3H - E_2

C – zawiesina węgla aktywnego zmieszanego z dekstranem

PPO – scyntylator I (emisja fali o długości 3700 Å)

POPOP – scyntylator wtórny (emisja fali świetlnej o długości 4250 Å)

A, B, C, D, E....Z – nieznane oznaczane próbki biologiczne (pożywki, osocze, homogenaty)

c – stężenie hormonu w oznaczanych próbkach odczytane z krzywej wzorcowej