



# **INSTRUMENTACE RADIOIMUNOANALÝZY**

**Ing. Martina Podborská, Ph.D.**

**OKB FN Brno**

**Školní rok 2016/2017**

# Imunoanalytické metody

- ❑ stanovení bílkovin, antigenů, haptenu (hormonů, léčiv, specifické IgE atd.)
- ✓ citlivější než imunoprecipitační metody
- ✓ vhodné pro koncentrace < 1 mg/l
- ✓ využívají značený indikátor (značenka = tracer)  
– Ag nebo Ab
- ✓ značkami mohou být:
  - ✓ radioizotopy, fluoreskující látky, enzymy, substráty, komplexy těžkých kovů, cheláty lanthanoidů
- ✓ podle typu značenky:
  - ✓ izotopová imunoanalýza – RIA, IRMA
  - ✓ enzymoimunoanalýza – EIA, IEMA
  - ✓ fluoroimunoanalýza – FIA, IFMA
  - ✓ luminoimunoanalýza – LIA, ILMA
  - ✓ chemiluminiscence – ICMA, CLIA, ECL

# Imunoanalytické metody

---

- ✓ značenky umožňují detekovat volný n. na protilátku vázaný Ag
- ✓ požadavky na značenku:
  - ✓ snadná vazba na Ag nebo na Ab
  - ✓ snadné měření + dobré rozlišení signálu a pozadí
  - ✓ nesmí interferovat při reakci Ag a Ab
  - ✓ levný a netoxický
- ✓ dle uspořádání imunoanalýzy rozlišujeme:
  - ✓ KOMPETITIVNÍ: omezené množství Ab, značený je obvykle Ag
  - ✓ NEKOMPETITVNÍ (imunometrická, sendvičová): Ab v nadbytku, značená je obvykle Ab
  - ✓ Heterogenní: vyžaduje separaci volné a vázané frakce Ag
  - ✓ Homogenní: nevyžaduje separaci volné a vázané frakce Ag

# Kompetitivní imunoanalýza

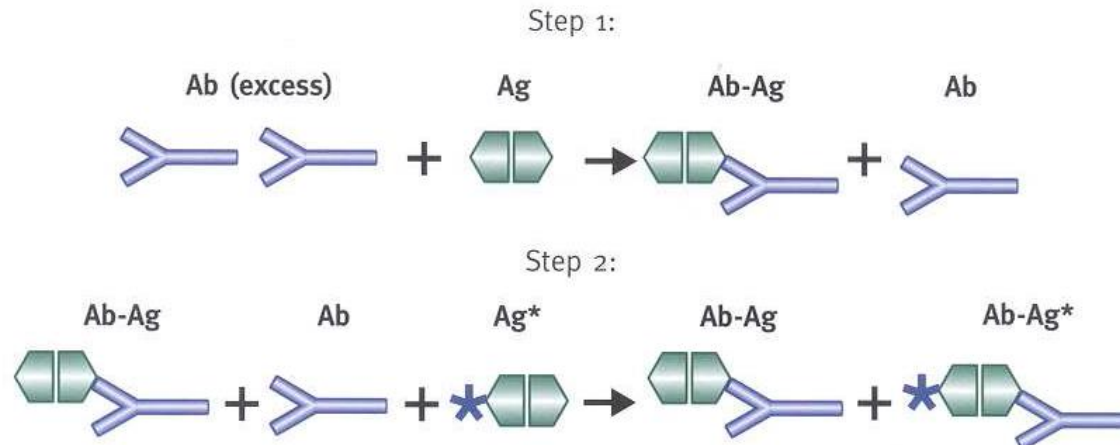
- nepřímá úměra mezi stanovovaným Ag a intenzitou signálu:

- **1. stupňová:**



Ag - stanovovaný analyt

- **2. stupňová: 2-4 vyšší citlivost; nadbytek Ab v prvním kroku:**



- **vyžadují delší inkubaci**

# Nekompetitivní (sendvičová) imunoanalýza

- přímá úměra mezi stanovovaným Ag a intenzitou signálu



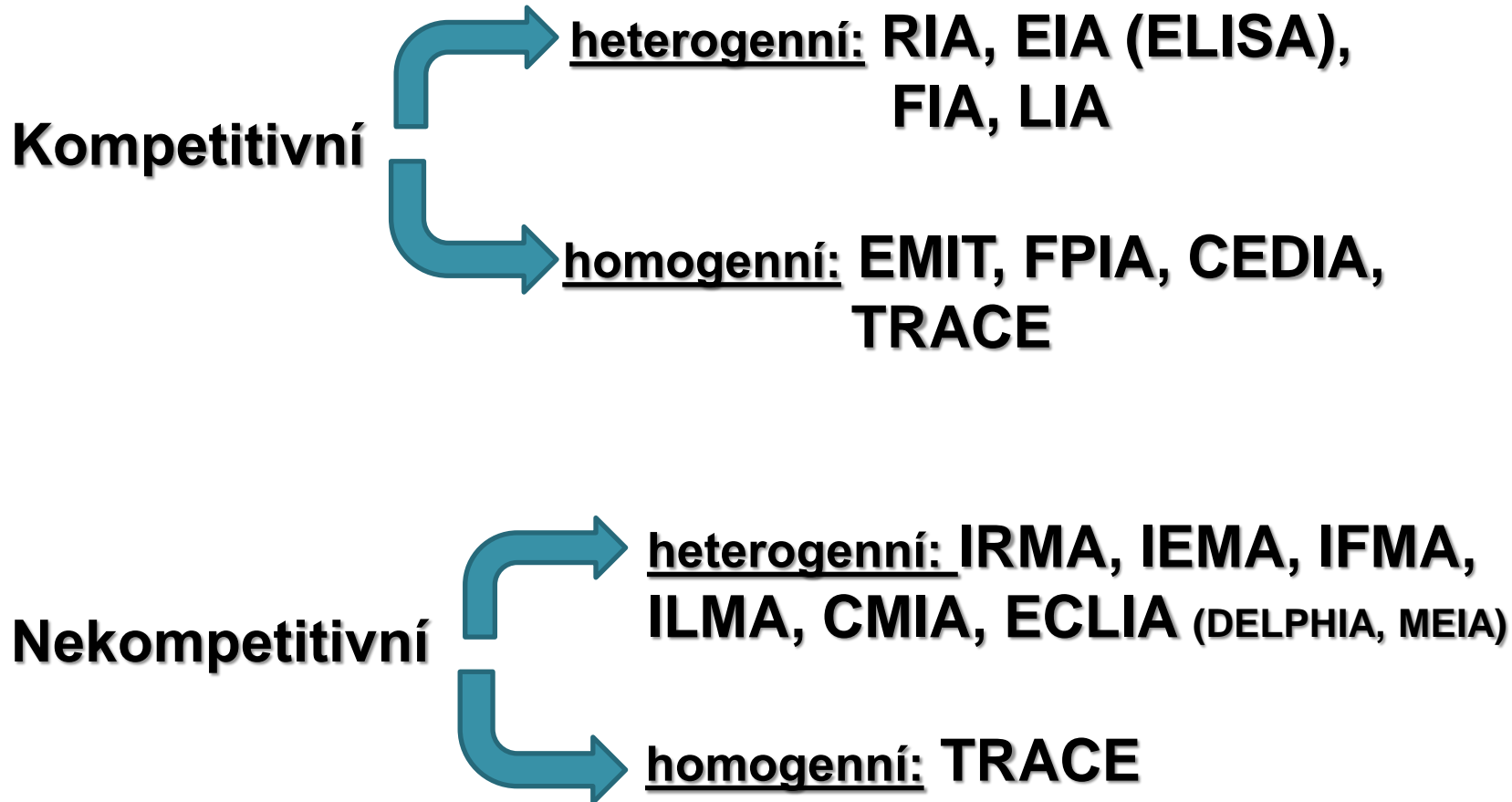
Ag resp.  $\text{Ab}_1\text{-Ag-Ab}_2^*$  – stanovovaný antigen/analyt;  
minimálně 2 antigenní determinanty na Ag

$\text{Ab}_1$  – většinou vázána na pevnou fázi

- mohou být 1 i 2 krokové
- 2 krokové sendvičové metody poskytují nejvyšší specifitu a senzitivitu
- citlivost metod souvisí s hranicí detekce značeného ligandu

# Rozdělení imunoanalytických metod

---



# RADIOZOTOPOVÉ IMUNOANALYTICKÉ METODY (RIA)



- **ZROD RIA:**
  - **Rosalyn Yalow (1921\*) and Solomon Berson popsali první RIA v r. 1957**
  - **Nobelova cena za fyziologii a lékařství v r. 1977**

# Radioizotopové indikátory



## ✓ Výhody:

- ✓ flexibilita
- ✓ citlivost
- ✓ velikost molekul

## □ Nevýhody:

- toxicita
- poločas rozpadu
- dodatečné náklady

- $^{125}\text{I}$  – gama zářič – poločas rozpadu 60 dní; radiojód ve formě alkalických jodidů
- $^3\text{H}$  – beta zářič – poločas rozpadu 12,3 let; když ze stérických důvodů nelze použít jód (detekce beta zářice je obtížnější; dodává se jako plyn ( $\text{T}_2$ ) nebo jako supertěžká voda ( $\text{T}_2\text{O}$ ))



# RADIOZOTOPOVÉ IMUNOANALYTICKÉ METODY (RIA)



- kompetitivní radioimunoanalýza:
  - RIA – radioimunoanalýza (immunoassay)
- nekompetitivní (sendvičová) radioimunoanalýza:
  - IRMA – imunoradiometrická analýza
- všechny izotopové metody jsou heterogenní
- měří se radioaktivní záření
- vysoce citlivá a specifická metoda
- RIA:
  - Ab v tekutém stavu
  - s Ab vázanou na pevné fázi

# RIA - Radioimmunoassay



- ❑ kompetitivní heterogenní izotopová imunoanalytická metoda (aldosteron, androstendion, 17-OH-progesteron, TRAK)
- ❑ radioindikátorem je  $^{125}\text{I}$  = gama-zářič (poločas rozpadu 60 dní)
- ❑  $\gamma$ -counter se scintilačním detektorem se studnovým scintilačním krystalem NaI + Tl – zářiče  $\gamma$  (= oba přeměňují energii IZ absorbovanou v roztoku na záblesky viditelného světla (scintilace), které registruje fotonásobič)



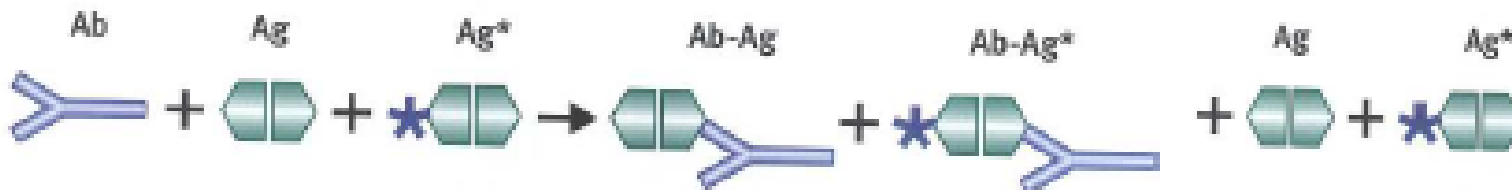
❑  $\gamma$ -counter Berthold



❑  $\gamma$ -counter Wizard

- ❑ s každou sérií měření se zpracovává kalibrační křivka
- ❑ radioindikátorem značený Ag
- ❑ Ab v limitovaném množství (navázáno 20-80% značeného)

# RIA - Radioimmunoassay

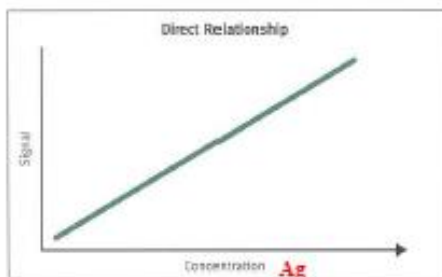


- oddělení  $\text{Ab-Ag}^*$  a  $\text{Ag}^*$

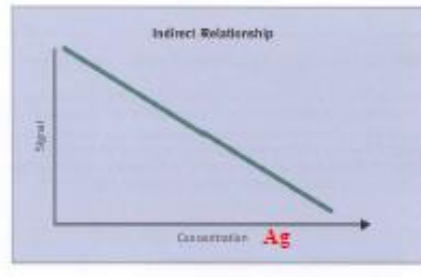
$\text{Ag}$  - stanovovaný analyt

- $\text{Ag}$  a  $\text{Ag}^*$  se odmyje, odsaje
- měří se radioaktivita imunokomplexu  $\text{Ab-Ag}^*$ , která je nepřímo úměrná koncentraci stanovovaného  $\text{Ag}$

měření signál volného  $\text{Ag}^*$



měření signál  $\text{Ab-Ag}^*$



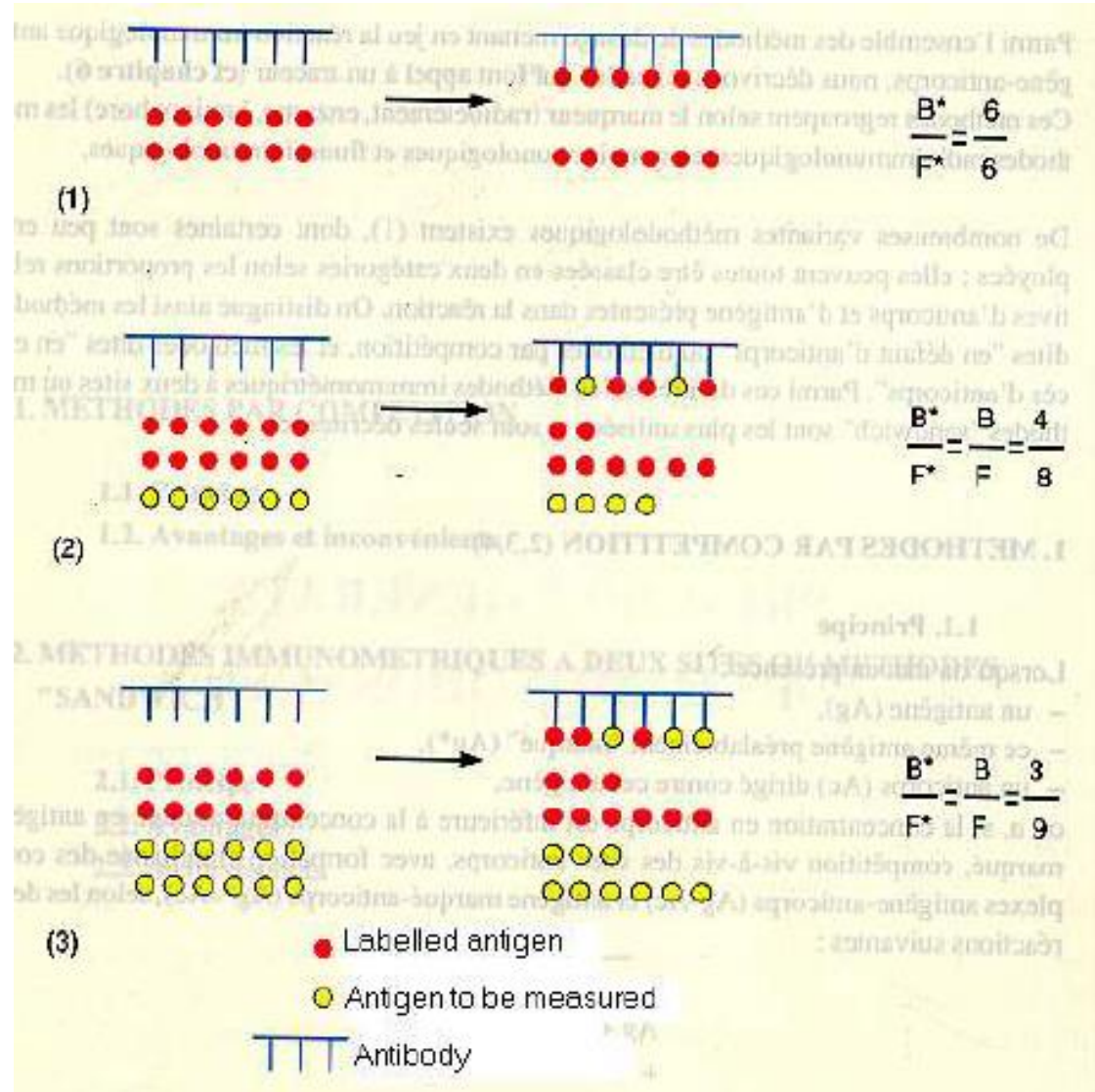
- citlivost metody je dána afinitou použité protilátky

# RIA - Radioimmunoassay



□ Kompetice:

- radioaktivitou značený Ag\* soutěží s neznačeným Ag o limitované množství vazebných míst na protilátce

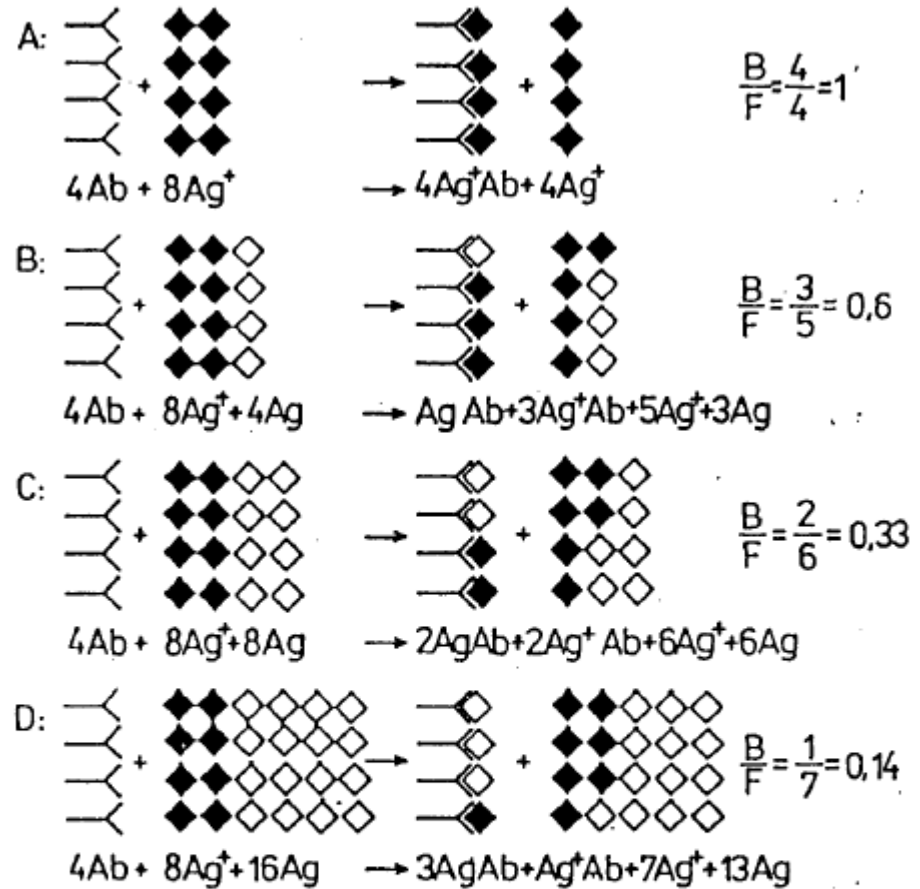


# RIA - Radioimmunoassay



## □ Kompetice:

- radioaktivitou značený Ag\* soutěží s neznačeným Ag o limitované množství vazebných míst na protilátce

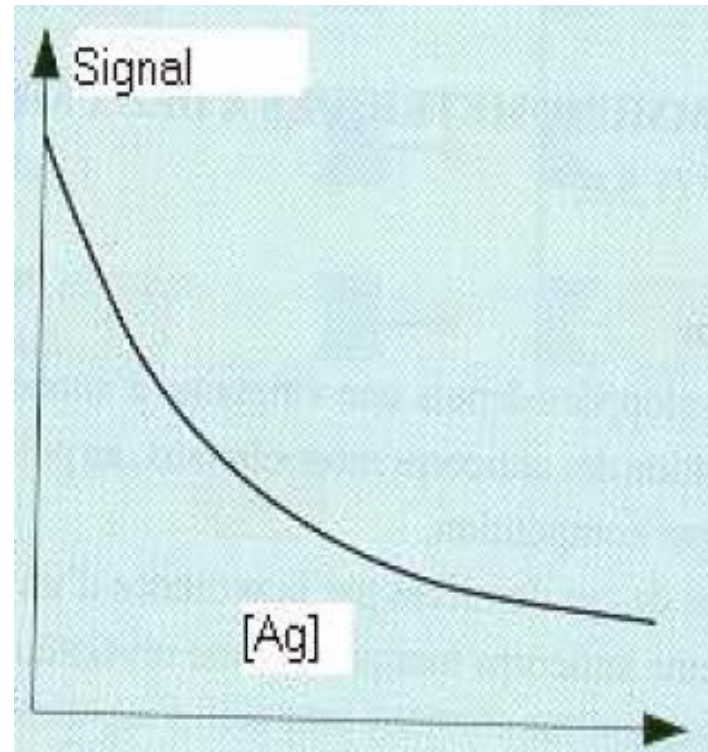


- protilátka
- značený antigen
- neznačený antigen
- neznačený komplex
- značený komplex

# RIA - Radioimmunoassay



## □ Kompetice:



- čím větší množství neznačeného antigenu je přítomno, tím menší množství značeného antigenu se naváže na protilátku a opačně
- nepřímá úměra: čím větší intenzita signálu, tím menší koncentrace stanovovaného Ag

# SCHÉMA POSTUPU RIA (komp.)



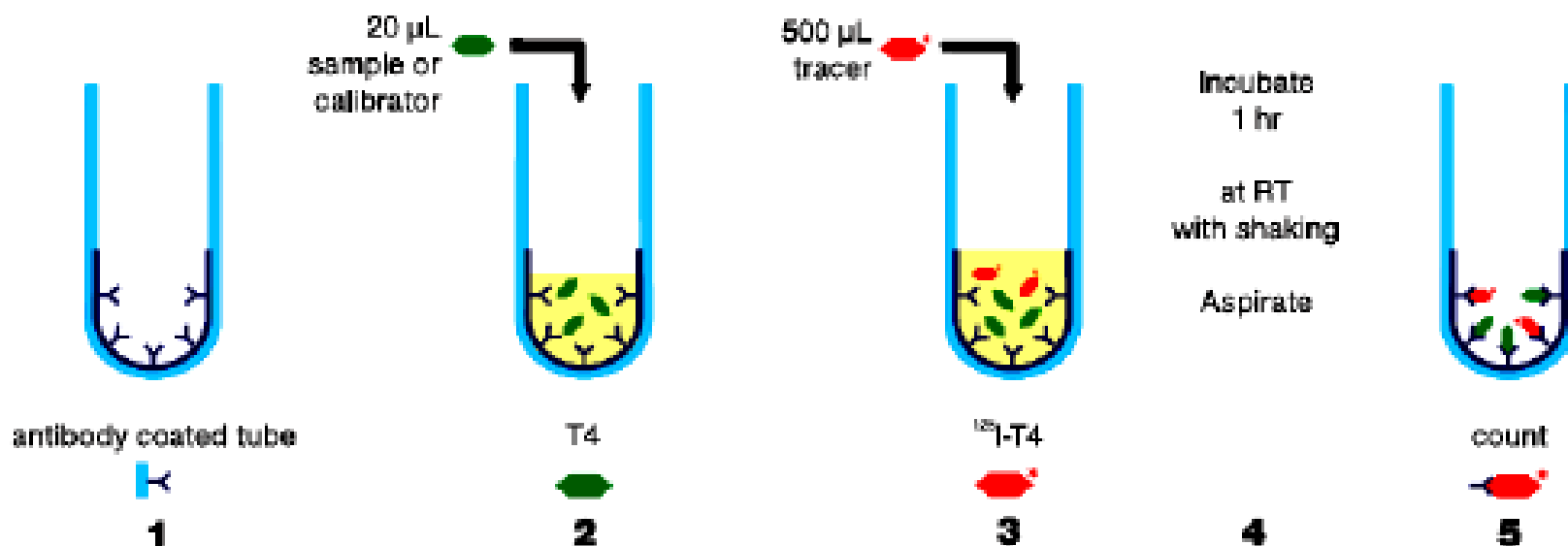
- Ab je navázána na pevnou fázi („imunosorbentu“ = tzn. že vnitřní stěna zkumavek je potažena Ab)

## 1. Pipetace:

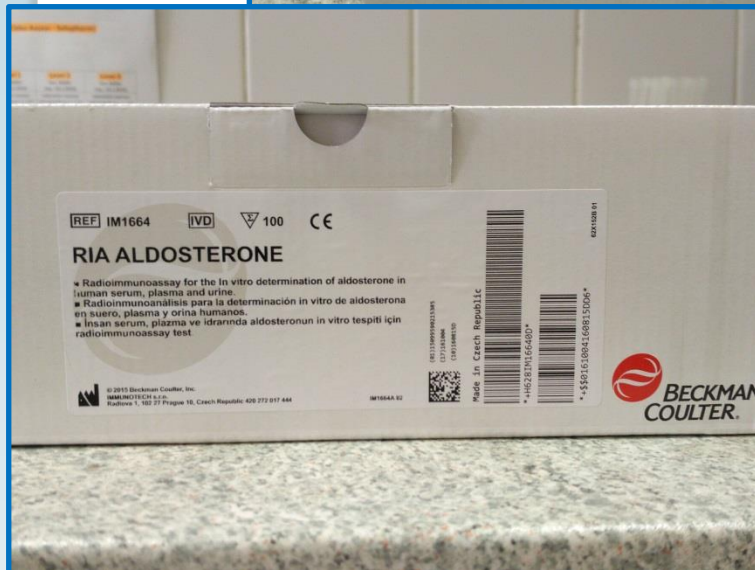
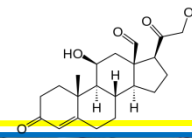
- ✓ do zkumavek potažených Ab postupně napipetujeme: kalibrátory/kontroly/vzorky séra/plazmy + radiondikátor
- ✓ směs se promíchá

## 2. Inkubace: 1–3 h při 18-25°C za stálého třepání (350 rpm)

3. Měření: obsah zkumavek se pečlivě odsaje (tím oddělíme volné imunokomplexy a volné Ag; neodsajeme pouze zkumavku pro stanovení celkové aktivity T) a změříme cpm pro vazebnost (B) a celkovou aktivitu (T) po dobu 1 min

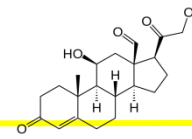


# Stanovení aldosteronu





# Stanovení aldosteronu

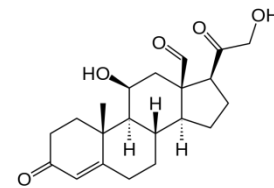


- ❑ RIA kit pro stanovení aldosteronu

- ❑  $\gamma$ -counter Berthold



# Stanovení aldosteronu



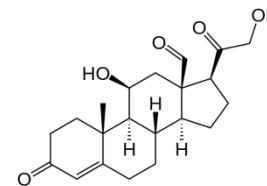
## 1. Pipetace:

- ✓ do zkumavek potažených Ab postupně napipetujeme:  
50  $\mu$ l kalibrátory/kontroly/vzorky séra/plazmy  
+ 500  $\mu$ l radiondikátoru  
(500  $\mu$ l radioindikátoru do zkumavky nepotažené  
určené pro stanovení celkové  
Ab a  
aktivity)
- ✓ směs se promíchá

## 2. Inkubace: 3 h při 18-25<sup>0</sup>C za stálého třepání (350 rpm)

3. Měření: obsah zkumavek se pečlivě odsaje (tím oddělíme volné imunokomplexy a volné Ag; neodsajeme pouze zkumavku pro stanovení celkové aktivity T) a změříme cpm pro vazebnost (B = impulzy) a celkovou aktivitu (T) po dobu 1 min.

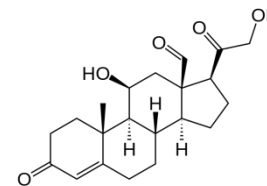
# Stanovení aldosteronu



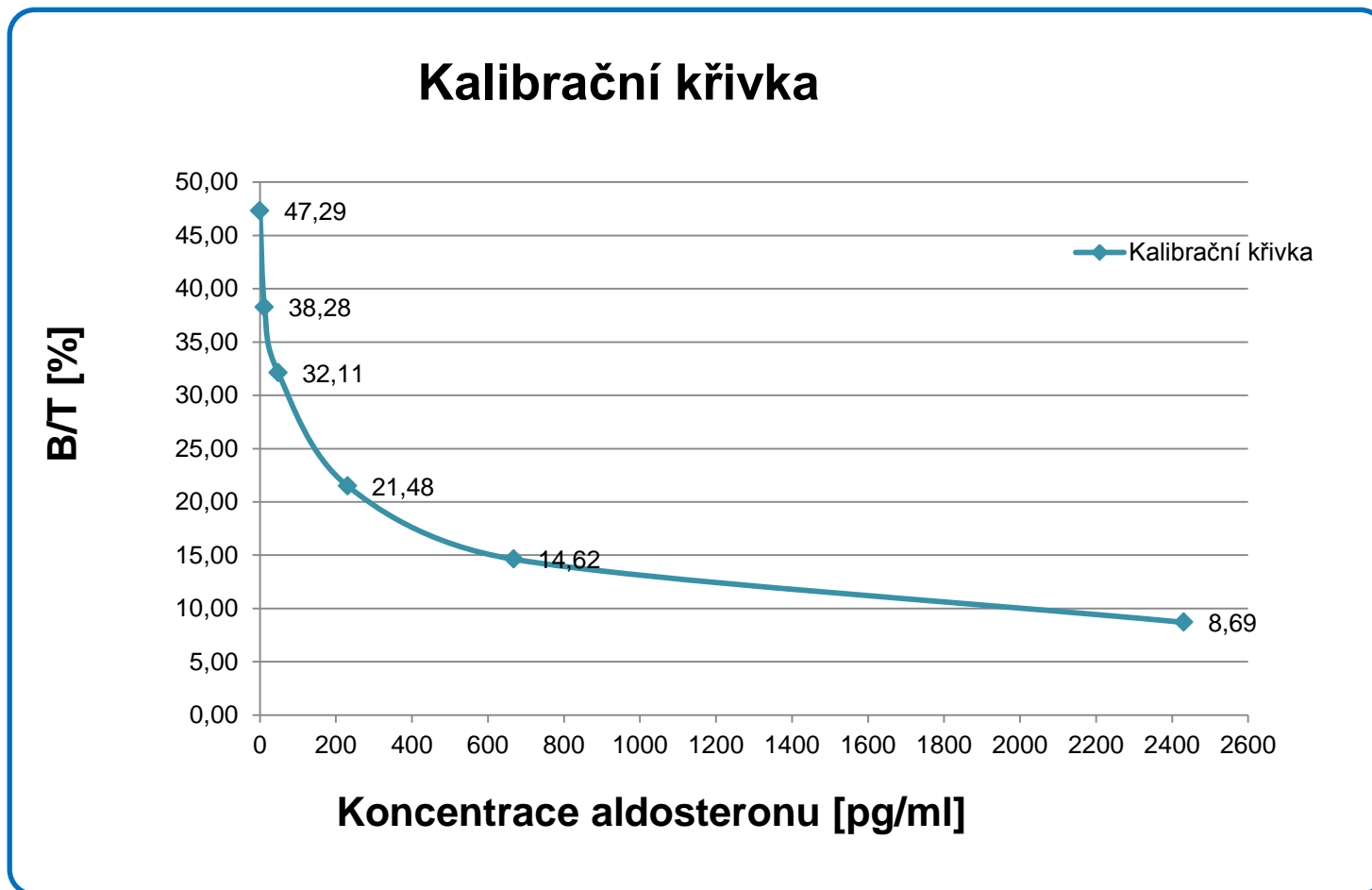
## □ kalibrační křivka:

Kalibrátory	Aldosteron [pg/ml]	cpm (n=3)	B/B <sub>0</sub> [%]	B/T [%]
0	0	15 800	100	47,29
1	12	12 788	80,9	38,28
2	48	10 728	67,9	32,11
3	231	7 176	45,4	21,48
4	668	4 883	30,9	14,62
5	2 431	2 904	18,4	8,69
Total cpm: 33 409 cpm				

# Stanovení aldosteronu



□ kalibrační křivka:



# RIA - Radioimmunoassay



## □ Výhody:

- vysoká citlivost
- robustnost
- malá spotřeba antiséra
- možnost automatizace

## □ Nevýhody:

- nebezpečí radioaktivního záření
- krátká expirační doba souprav
- nutno pracovat v sériích
- měřit v duplikátech

**Je třeba dbát bezpečnostních předpisů pro práci s radioizotopy!**



**Děkuji za  
pozornost.**