RADIOIMUNOANALÝZA (RADIOIMMUNOASSAY)

Převzato: sciencephoto.com
Test krve hepatitis virus

RADIOIMUNOANALÝZA

- ✓Stanovení látek, proti kterým lze připravit protilátky
- ✓ng (10^{-9} g) až pg (10^{-12}g)
- ✓ve složitých biologických směsích (krevní sérum, moč aj.)

Princip:

kompetice radioaktivně značeného a neznačeného antigenu o vazbu na protilátku.

Úkol: stanovit koncentraci látky X

Postup:

- připravit protilátky proti X: Ab (polyklonální nebo monoklonální)
- označit stanovovanou látku X pomocí
  - I^{125} nebo I^{131} pro proteiny
  - H^3 nebo C^{14} pro nízkomolekulární haptény

Systém:

1) protilátky Ab
2) značená látka X^x
3) neznačená látka X (známá koncentrace)
4) neznačená látka X (neznámá koncentrace)

Jak postupovat?

Sada zkumavek:

Stejné množství X^x + Ab (50 až 60% X^x se váže s Ab)

Do části zkumavek se přidá známá konc. X (standardy)

Do dalších se přidají neznámé konc. X (vzorky)

$$X^x + X + Ab \rightleftharpoons X^x\text{-}Ab + X$$
$$X\text{-}Ab + X^x$$

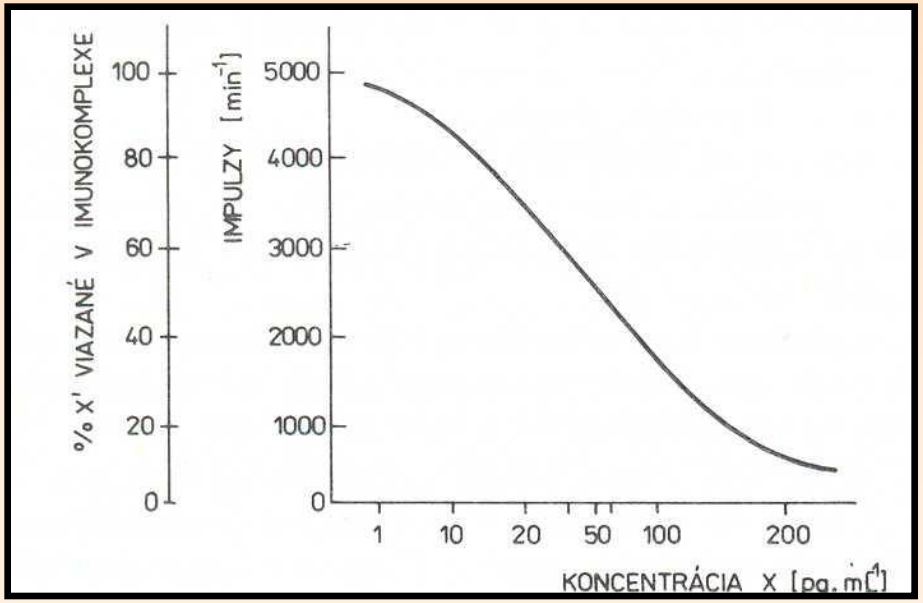
V roztoku se nachází: X^x, X, X^x-Ab, X- Ab

Čím více X bude v roztoku, tím méně X^x se bude moci s Ab vázat.

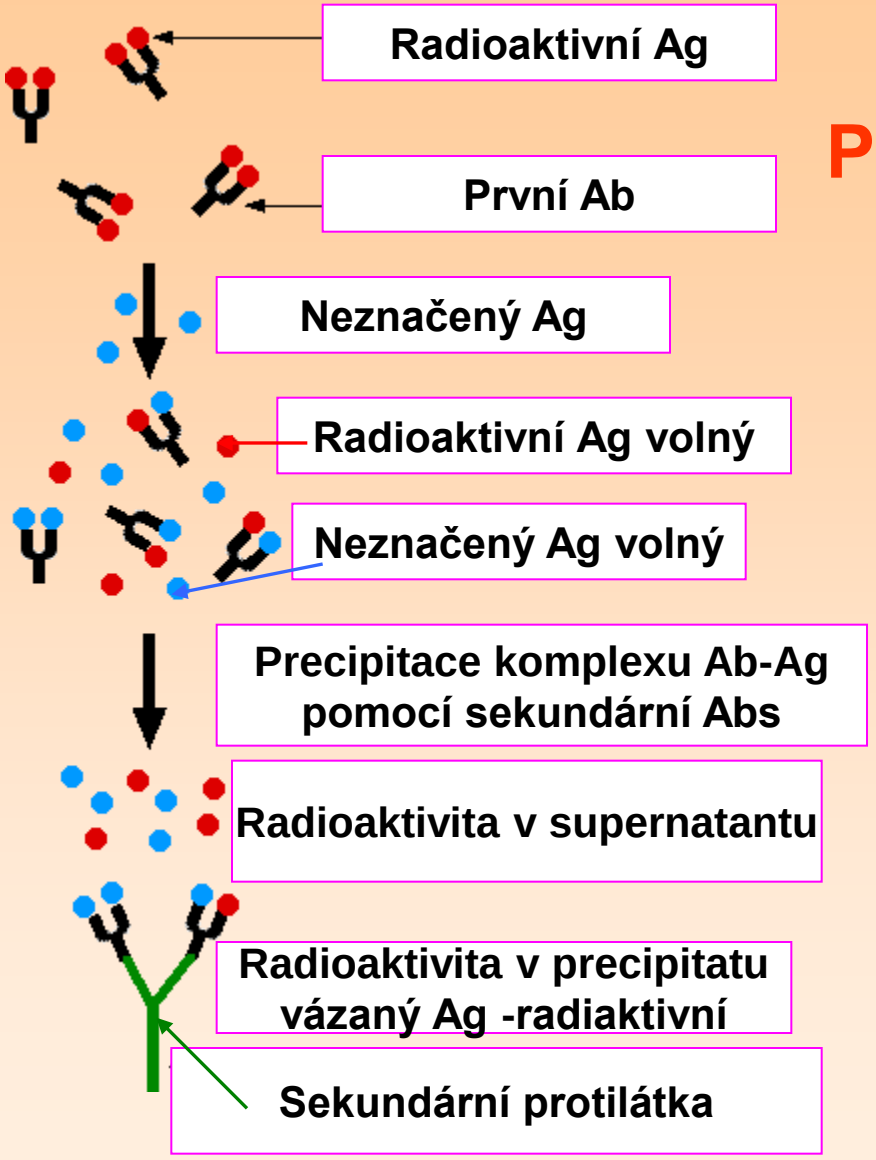
X^x je v roztoku stále stejné, proto počet molekul v komplexu X^x-Ab je dán koncentrací X.

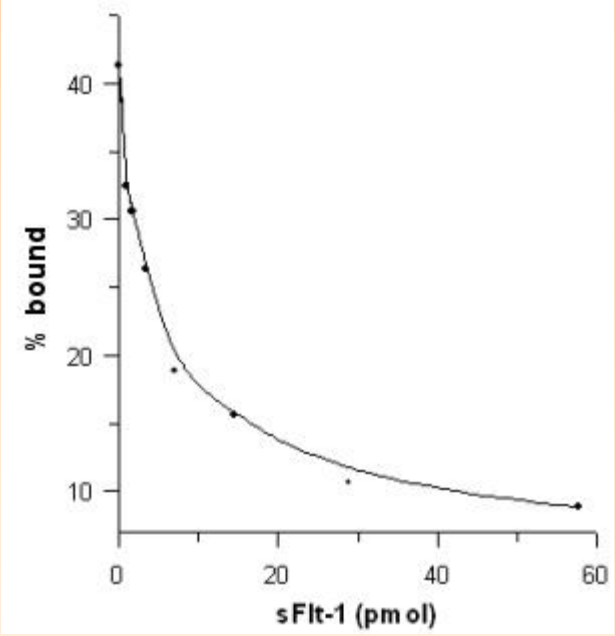
sada standardů (X známé)
Pomocí této sady se zjistí množství X^x vázané v imunokomplexu při určitých koncentracích X.
Výsledek: analytická křivka:
závislost množství X^x vázané v komplexu při určitých koncentracích X:
Tvar křivky: sigmoidní
přímkový
hyperbolový

y osa: počet rozpadů radioizotopu ve formě impulzů scintilačního radiometru/min
nebo % látky X^x vázané



Princip radioimunoanalýzy





GAMMA COUNTER LB-4
COUNTER
CPM

Oddělení imunokomplexu:

- metody imunochemické
- metody fyzikálně chemické

Imunochemická metoda je založena na použití sekundární protilátky, která je specifická proti primární protilátce.

komplex X^x-Ab + Abs ⟶ komplex X^x-Ab-Abs,

který precipituje a jde oddělit centrifugací

obměna: sekundární protilátka se naváže na nerozpustný nosič – imunosorbent, který pak reaguje s komplexem X^x-Ab

jako primární Ab lze použít i neprecipitující monoklonální protilátky

Fyzikálně-chemické separační metody

- různou pohyblivost ligandu a imunokomplexu
- různou hmotnost ligandů a imunokomplexu
- schopnost komplexu X^x-Ab precipitovat s neutrální solí
- adsorbce volné látky X a X^x na aktivní uhlí nebo ionex
- vazba ligandu na protilátku, která je v tuhé fázi

vazba ligandu na protilátku, která je v tuhé fázi

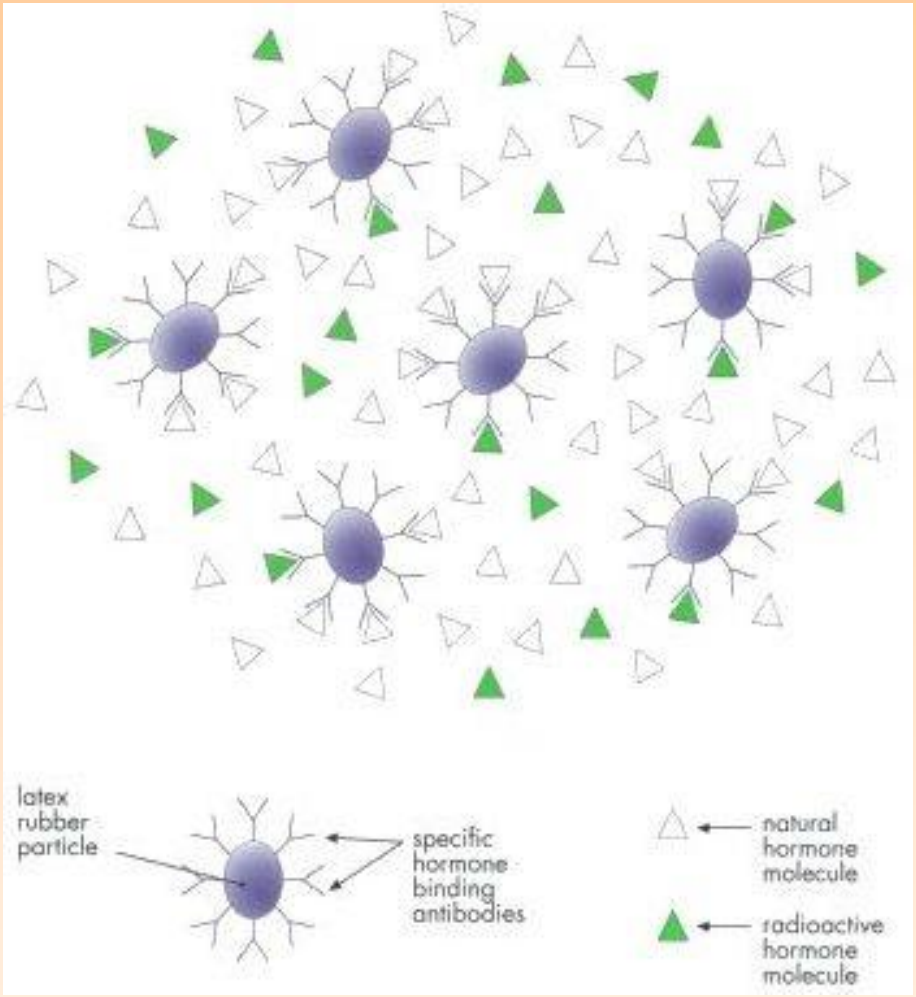
radioimunoanalýza v tuhé fázi
(*solid phase radioimmunoassay)*
Ab se naváže na nerozpustný nosič a ke směsi X a X^x
Komplexy X^x-Ab a X-Ab
jsou nerozpustné a lze je oddělit od rozpustných X a X^x

Základní podmínka RIA stanovení:

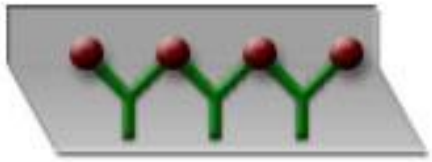
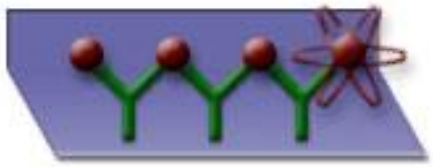
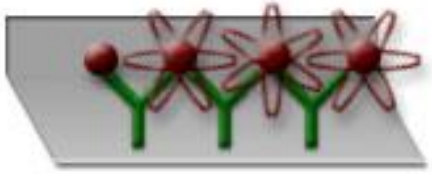
- **kvalitní protilátka**
  hyperimunitní sérum (několik měsíců až půl roku)
  monoklonální protilátky (není třeba čistý Ag)
- **čistý antigen**

Komerční soupravy

firmy vyrábějí hotové soupravy-sety:
specifické Ab, radioaktivně značený Ag nebo haptén,
standardní roztoky,



Stanovení hormonu

REAGENTS:	POSITIVE SAMPLE	NEGATIVE SAMPLE
Ab specific for hormone (coating the filter) Unknown sample with hormone Allow time to react Wash away unbound substances	high level of hormone 	low level of hormone
REAGENTS: ^{125}I-labeled hormone Allow time to react Wash away unbound radiolabeled hormone		
PROCEDURE: measure radioactivity in a gamma counter RESULT: amount of radioactivity is inversely proportional to the concentration of hormone in the sample.		

Niektoré látky, ktorých koncentráciu v biologických kvapalinách možno určiť rádioimunoanalýzou (RIA) pomocou komerčne dostupných súprav

Látka	Izotop	Citlivosť [pg/mL]
ACTH	^{125}I	1 až 2
Aldosteron	^{3}H	5
Angiotenzín II	^{125}I	50
c-AMP, c-GMP	^{125}I	10 až 20
Barbituráty	^{3}H	10 000
Digoxín	^{3}H	100
IgD	^{125}I	0,5 U*)
IgE	^{125}I	1,0 U*)
Inzulín	^{125}I	5
Kalcitonín	^{125}I	10
Kortikosteron	^{3}H	100
Kortizol	^{3}H	100
LSD	^{125}I	100
Morfín	^{125}I	500
	^{3}H	5 000
Ouabaín	^{3}H	200
Progesteron	^{3}H	20
PGE_2	^{3}H	10
$PGF_{2\alpha}$	^{3}H	5
Testosteron	^{3}H	50
Tyroxín	^{125}I	2 000

*) Citlivosť je vyjadrená v medzinárodných jednotkách na mL.

Výhody RIA

- ✓ vysoká citlivost
- ✓ možnost automatizace

Nevýhody RIA

- ✓ nutnost separačního mezistupně
- ✓ zdravotní rizika –ozáření
- ✓ krátký poločas rozpadu (transport izotopů)
- ✓ nákladné zařízení