

Afdeling SERH Datum: 1983-09-06
RAPPORT 83.74 Pr.nr. 505.0620
Onderwerp: Verslag van een stage op het
gebied van radio-immuno-assays bij de
Stichting Medische Laboratoria/Bergschot
Centrum voor Onderzoek te Breda
1983-07-25/1983-08-26.
Bijlage: 2

() Verzendlijst: directeur, direktie VKA, sektorhoofd, afdeling SERH (6x),
afdeling Normalisatie (Humme), projektbeheer, projekt-
leider, Schmidt (BCO), Kuijpers (BCO), Stephany (RIV)

Projekt: Ontwikkelen methoden voor het aantonen en bepalen van hormonen.

Onderwerp: Verslag van een stage op het gebied van radio-immuno-assays bij de Stichting Medische Laboratoria/Bergschot Centrum voor Onderzoek te Breda 1983-07-25/1983-08-26.

Doel:

Het verkrijgen van meer inzicht en ervaring op het gebied van radio-immuno-assays (RIA) in het algemeen.
Een onderzoek uitvoeren naar de invloed van de pH van de hydrolyse op de resultaten van de bepaling van diethylstilbestrol in urine volgens de methode die bij BCO en RIKILT wordt toegepast.

Samenvatting:

De stage heeft plaatsgevonden op het Isotopenlaboratorium van de Stichting Medische Laboratoria (SML) te Breda, o.l.v. Drs N.A. Schmidt, hoofd van het laboratorium en A.D. Kuypers.

In dit verslag zijn bepalingsmethoden vermeld voor enkele hormonen zoals Cortisol, Oestradiol, Progesteron en Thyroxine zoals deze bij BCO bepaald worden. Met betrekking tot de RIA in het algemeen worden enkele experimenten met γ -stralers weergegeven en wordt weergegeven waarop een antiserum wordt getest.

Verder wordt nagegaan wat de invloed van de pH van de hydrolyse bij de bepaling van DES is, door de RIA-DES bepaling met chromatografische voorzuivering uit te voeren bij pH 5 en 7.

Conclusies

Op het gebied van de radio-immuno-assays is daadwerkelijk ervaring opgedaan zowel op theoretisch als praktisch gebied.

Het uitgevoerde onderzoek naar de invloed van de pH van de hydrolyse op de resultaten van de bepaling van diethylstilbestrol gaf als conclusies:

- a. verandering van hydrolysevloeistof is goed toepasbaar voor alle RIA-DES bepalingen in urine (vers en oud)
- b. de resultaten van gehalten van DES in urine in het gebied van pH 5 tot 7 bij de hydrolysestap verschillen niet significant.

Verantwoordelijk: dr W.G. de Ruig
Samensteller: G.D. van Bruchem
Projektleider: dr W.G. de Ruig

R
R

1. Inleiding

De S.M.L. (Stichting Medische Laboratoria) is ingesteld om laboratoriumservice te verlenen aan specialisten, huisartsen, dierenartsen, ziekenhuizen, instituten en overheidsinstellingen. Het Isotopenlaboratorium verricht routinematig onderzoek naar ondermeer hormonen en allergenen. Daarnaast ontwikkelt deze afdeling nieuwe RIA-methoden op het gebied van medisch gezien belangrijke verbindingen.

Doelstelling van deze stageperiode was het verkrijgen van meer inzicht op het gebied van de Radio-Immuno-Assays.

Hiertoe zijn enkele bepalingen gevolgd, enkele experimenten uitgevoerd met andere isotopen en een ander antiserum voor progesteron getest. Er is een onderzoek verricht naar de resultaten van de DES-bepaling in urine, wanneer de pH van de hydrolysebuffer en urine gevarieerd wordt.

2. Hormonen

Enkele hormonen die men op het Isotopenlaboratorium bepaalt zijn o.a. Aldosteron, Cortisol, Progesteron, Oestradiol, Testosteron, T3, T4 (thyroxine).

Voor de bepaling van deze hormonen maakt men gebruik van RIA-technieken met ^3H en ^{125}J als gelabelde hormonen.

De metingen vinden meestal plaats in serum, direkt of na extractie. In het laatste geval neemt men het extrakt na indampen op in een buffer, waarna in een aliquot een RIA uitgevoerd wordt.

Hormonen zijn in het bloed voor een gedeelte gebonden aan eiwit.

Extraktie met een organisch oplosmiddel "verbreekt" deze binding zodat men over het vrije hormoon beschikt. Het hormoon wordt, bij een direkte RIA, van het eiwit "verbroken" d.m.v. een eiwitprecipitatie of door toevoeging van een blokker. Deze blokker verdringt het hormoon van het eiwit.

2.1 Cortisol

Serum inzet volume: 0,1 ml (1:25) met BSA-buffer (bovine serum albumine in fosfaatbuffer).

Antiserum Cortisol: de antiserumverdunding wordt zodanig gekozen dat deze een binding met de nulstandaard aangaat van 30-60%.

Het antiserum wordt verdund met BSA-buffer.

Tracer: ^3H -Cortisol in ethanol, werkverduunning: 12.000 dpm/0,1 ml in BSA-buffer.

Bereik standaardcurve: 11-23-45-91-181-363-725 pg/100 μl .

Incubatietijd voor standaarden en serum met BSA-buffer: 10 min bij 70°C.

Incubatietijd: 30 min bij 37°C

5 min bij 4°C.

Scheiding actieve kool: Dextran T70 0,5 g

BSA (poviet) 2,0 g

Norit A "Speciaal" 5,0 g

oplossen in 1 l fysiologische zoutoplossing

kontakttijd: 10 min.

Scintillatievloeistof: Pico-fluor 30 2,5 ml.

2.2 Oestradiol

Serum inzet volume: 0,25 ml.

Extraktievloeistof: ether 2,5 ml.

Riabuffer: Fosfaatbuffer 0,06 mol/l; 0,01 mmol/l EDTA, 0,1% BSA.

Tracer: 2,4,6,7- ^3H oestradiol in benzeen/ethanol (9+1)

werkoplossing: 12.500 dpm/0,1 ml RIA-buffer.

Antiserum Oestradiol: Pratt Groningen.

Bereik standaardcurve: 2-1-0,5-0,25-0,12 nmol/l RIA-buffer.

Incubatietijd: 30 min bij 37°C

15 min bij 0°C.

Scheiding: actieve kool: zie cortisol

kontakttijd: 10 min.

Scintillatievloeistof: Pico-fluor 30 2,5 ml.

2.3 Progesteron

Serum inzet volume: 0,1 ml.

Extraktievloeistof: n-hexaan 5,0 ml.

RIA-buffer: fosfaatbuffer 0,06 mol/l, 0,01 mmol/l EDTA, 0,1% BSA.

Tracer: 1,2,6,7- ^3H -progesteron in benzeen

werkoplossing: 15.000 dpm/0,1 ml RIA-buffer.

Antiserum Progesteron: IRE, AS 21, batch PPl.

Bereik standaardcurve: 12,5-6,2-3,1-1,6-0,8-0,4 nmol/l RIA-buffer.

Incubatietijd: 30 min bij 37°C

30 min bij 4°C.

Scheiding: aktieve kool: zie cortisol

kontakttijd: 10 min.

Scintillatievloeistof: Pico-fluor 30 2,5 ml.

2.4 Labelling ^{125}J Thyroxine (T₄)

Principe: Aan trijoodthyronine wordt met de chlooramine T-procedure een atoom ^{125}J gekoppeld, waardoor ^{125}J thyroxine ontstaat. Het gevormde hormoon wordt gezuiverd door kolomchromatografie en geconcentreerd m.b.v. een ionenwisselaar.

A. Labelling

In een slangetje worden m.b.v. micro-injektiespuit achteréénvolgens opgezogen:

1. natriummetabisulfiet	20 μl
2. lucht	10 μl
3. buffer II (0,05 M fosfaatbuffer)	5 μl
4. lucht	20 μl
5. chlooramine T	20 μl
6. lucht	10 μl
7. buffer II	5 μl
8. lucht	10 μl
9. T ₃ oplossing	5 μl
10. lucht	10 μl
11. buffer II	5 μl
12. lucht	10 μl
13. ^{125}J Jodide	250 μCi
14. lucht	10 μl .

Breng in het reaktievaatje 50 μl fosfaatbuffer (0,5 M) I.

Breng het slangetje onderin het reaktievaatje en voeg toe nr. 14 t/m 5.

Incubeer gedurende 30 sec (vortexen), voeg hierna 3,2 en 1 toe en meng wederom.

B. Zuivering

Het joderingsmengsel wordt op een met Sephadex G25 Fine gevulde kolom gebracht en de fraktieverzamelaar wordt gestart. Als elutie-vloeistof wordt een fosfaatbuffer 0,05 M pH 10,6 gebruikt zodanig dat de ruimte boven de kolomvulling geheel gevuld is met elutie-vloeistof.

Er worden ca. 100 frakties van 2 ml opgevangen, door de activiteit van elke fractie te meten is het elutiepatroon vast te stellen. Volgorde elutiepatroon: jodide, trijoodthyronine, thyroxine.

C. Concentrering

Elke fractie die T₄ bevat wordt op pH 11 gebracht en daarna over een harskolom geëlueerd met azijnzuur. De activiteit van de eluaten wordt gemeten en de frakties met de hoogste activiteit worden verzameld en geneutraliseerd tot pH 4-6 en verdund met propaandiol 1,2. Deze labelling leverde een recovery op van 20% (redelijk) en 50 µCi thyroxine.

2.5 Thyroxine (T₄)

Aan het incubatiemengsel bij de T₄ RIA-bepaling wordt ANS (8-anilino-1-naftaleensulfonzuur-natrium) toegevoegd om T₄ te verdringen van het TBG (thyroxinebinding globulin).

Serum inzet volume: 3 µl.

RIA-buffer: barbitalbuffer 0,075 M: 1% gelatine.

Tracer: T₄ ¹²⁵J/ANS-oplossing

werkoplossing: 40.000 cpm/0,1 ml RIA-buffer/ANS-oplossing (1+1).

Antiserum T₄: Biodate.

Bereik standaardcurve: 40-80-120-160-200 nmol/l T₄ vrij-serum.

Incubatietijd: 3 uur bij 20°C

5 min bij 0°C.

Scheiding: gekoelde PEG-oplossing (poly-ethyleen-glycol)

kontakttijd: 10 min.

Het supernatant wordt, na centrifugeren, afgezogen en de activiteit van het neerslag geteld (bound fractie).

3. Experimenten

3.1 Gamma-stralers

De γ-stralen (gamma-stralers b.v. ¹²⁵J) treden op verschillende wijzen in wisselwerking met materie. Dit resulteert in vorming van pulsen van verschillende grootte wat in een pulshoogte-spectrum wordt weergegeven, waarin het aantal pulsen van een bepaalde grootte (energie) tegen de pulshoogte is uitgezet.

Aan de hand van dit spectrum kan men de energie van de fotopiek (totale afgifte van de γ -energie) bepalen.

Voor ^{125}J , ^{57}Co en ^{137}Cs zijn pulshoogtespektra gemeten (zie bijlage 1).

3.2 In verband met het in gebruik nemen van een nieuw antiserum voor progesteron is dit antiserum getest door de antiserumverduunning, de dose-responsecurve, de gevoeligheid, de Scatchardplot en de kruisreacties te bepalen. Aan de hand van de resultaten weergegeven in de grafieken (zie bijlage 2) is de antiserumverduunning 1:8000, de gevoeligheid 0,23 nmol/l en zijn de kruisreacties met 17-OH-progesteron 0,027% en met cortisol $\ll 0,002\%$.

4. De invloed van de pH van hydrolysebuffer en van urine op de diethylstilbestrolbepaling

Uit eerdere resultaten (zie 2e ringonderzoek GC-MS/RIA) van DES-gehalten in urine is gebleken dat de resultaten daalden in de tijd. Oorzaak kan zijn dat de hydrolyse van gebonden DES niet volledig verlopen is. Volgens BCO en RIKILT voorschrift vindt de hydrolyse van gebonden DES (als DES-glucuronide en DES-sulfaat) in urine plaats na toevoeging van enzym (suc d'helix pommatia) in een bufferoplossing bestaande uit 0,1 mol/l PBS 0,05% gelatine pH 7,0 (de zgn. hydrolysebuffer).

De pH van verse urine daalt dan van ca. 7,5 tot ca. 7,0.

Bij oude urine kan de pH aanzienlijk opgelopen zijn, tot pH 9,5 en deze daalt dan met de bovenstaande hydrolysebuffer tot ongeveer pH 9,0.

Suc d'helix pommatia werkt bij pH 7 goed maar heeft een optimum bij pH 4,8. Het RIV hydrolyseert volgens hun voorschrift bij pH 7.

Wanneer het enzym in plaats van in bovengenoemde buffer opgelost wordt in 0,2 M natriumdihydrogeenfosfaat (NaH_2PO_4) daalt de pH sterker: voor verse urine van ca. 7,5 tot ca 5,0, voor oude urine van ca. 9,5 tot ca. 7,0.

Er is een onderzoek uitgevoerd naar de toepassingsmogelijkheden van NaH_2PO_4 als pH regelaar bij de bepaling van DES in urine.

Hierbij is aandacht besteed aan de volgende parameters:

- het al of niet algemeen toepasbaar zijn van deze aanzuring
- het verschil in resultaten wanneer de zuurgraad op pH 5 en op pH 7 wordt gebracht, d.w.z. de pH waarden die in 0,2 M NaH_2PO_4 worden bereikt voor verse resp. voor oude urine.

Als uitgangsmateriaal werd een "nulurine" genomen. Deze "nulurine" werd gesplitst en op pH 5 en pH 7 met o-fosforzuur gebracht. De "nulurine" werd opgehoogd met 2 verschillende "hoge" DES urines op niveaus van ca. 1-2-3-4-5 ng/ml. De monsters werden gehydrolyseerd met 0,2 M NaH_2PO_4 , 0,05% gelatine (pH 5) en 0,1 M PBS, 0,05% gelatine (pH 7,0). Aan beide hydrolysevloeistoffen was het enzym "Suc d'helix Pommatia" toegevoegd.

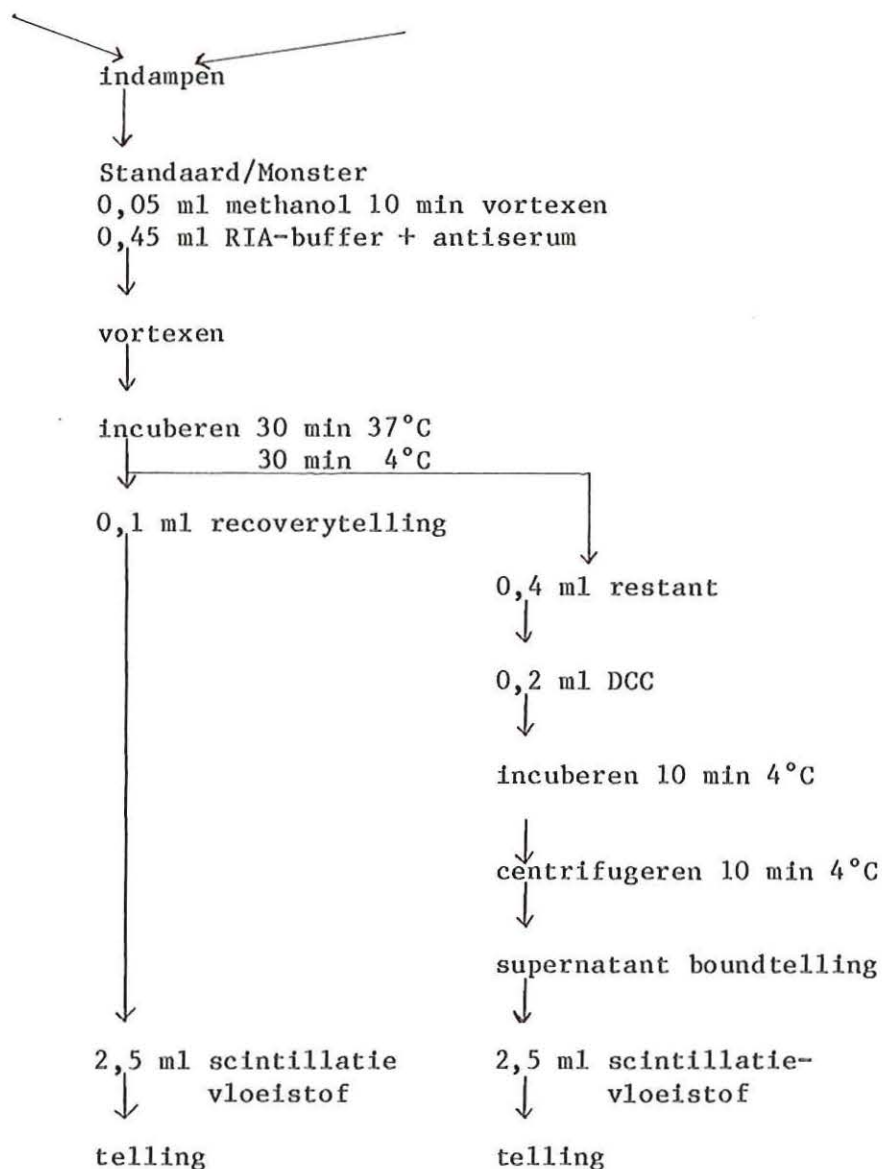
4.2 Werkwijze

De werkwijze wordt weergegeven door onderstaand blokdiagram.

Schema bepaling DES m.b.v. RIA



RIA



4.3 Resultaten

De resultaten zijn weergegeven in tabel nr. 1 waarbij ook de controle-urines zijn vermeld. De controle-urines zijn gehydrolyseerd bij pH 5. De ophoging van de "nulurines" met de "hoge" DES-urines heeft in de eerste serie (0818-1 t/m 0818-13) plaatsgevonden door toevoeging van een urine (0324-57) met een gehalte van ca. 100 ng/ml en in de tweede serie (0818-14 t/m 0818-20) door toevoeging van een urine (0413-7) met een gehalte van ca. 20 ng/ml.

Tabel nr. 1.

Monster nummer	Conc. DES na ophoging ng/ml	Gevonden gehalte pH5 ng/ml	Gevonden gehalte pH7 ng/ml
0818-1	-	0,2	0,3
	1	0,9	0,7
0818-2	-	0,0	0,1
	2	1,1	1,3
0818-7	-	0,1	0,0
	3	2,0	2,0
0818-8	-	neg	0,1
	4	2,7	2,4
0818-13	-	neg	neg
	5	4,0	3,6
controle-urine	0,5	0,4	
controle-urine	1,0	0,8	
controle-urine	2,0	1,4	
controle-urine	4,0	3,6	
controle-urine	8,0	6,4	
0818-14	-	0,1	0,3
	1	1,6	1,4
0818-15	-	0,0	0,1
	2	2,7	2,9
0818-16	-	0,1	0,0
	3	4,7	4,0
0818-17	-	0,0	neg
	4	6,2	5,0
0818-20	0	0,0	neg
	5,0	7,2	7,9
controle-urine	0,5	neg	
controle-urine	1,0	1,2	
controle-urine	2,0	1,2	
controle-urine	4,0	3,6	
controle-urine	8,0	8,0	

5. Conclusies

5.1 Door de stage is mijn inzicht in en ervaring met RIA-bepalingen aanmerkelijk vergroot.

5.2 Er werd ervaring opgedaan met de RIA-bepalingen voor Cortisol, Oestradiol, Progesteron en Thyroxine. De door mij voor deze stoffen uitgevoerde RIA's gaven resultaten die overeenkwamen met eerder door SML medewerkers verkregen uitkomsten.

5.3 De labelling van thyroxine (T₄) kost veel tijd met een lage opbrengst voor de gelabelde thyroxine.

5.4 Het antiserum voor de progesteronbepaling is zeer specifiek voor progesteron.

5.5 Het uitgevoerde onderzoek naar de invloed van de pH van de hydrolyse op de resultaten van de bepaling van DES gaf als resultaat dat, wanneer de pH van de urine bij de hydrolysestap pH 5 of 7 is, de gehalten niet significant verschillen.

Als 0,2 M NaH₂PO₄ als hydrolysevloeistof wordt gebruikt zal de pH van urine, wanneer deze ligt tussen de pH 7 en 9, komen in het gebied van pH 5 tot pH 7 zodat de pH geen invloed heeft op de resultaten. De natriumdihydrogeenfosfaatoplossing is toepasbaar voor alle RIA-DES bepalingen in urine (vers en oud).

6. Dankwoord

Ik ben veel dank verschuldigd aan drs N.A. Schmidt en aan al zijn medewerkers(sters), met name de heer A.D. Kuypers en mw L. van Bavel die mij gedurende de hele stageperiode hebben begeleid.

De prettige werksfeer zal mij lang in herinnering blijven.

03-08-83

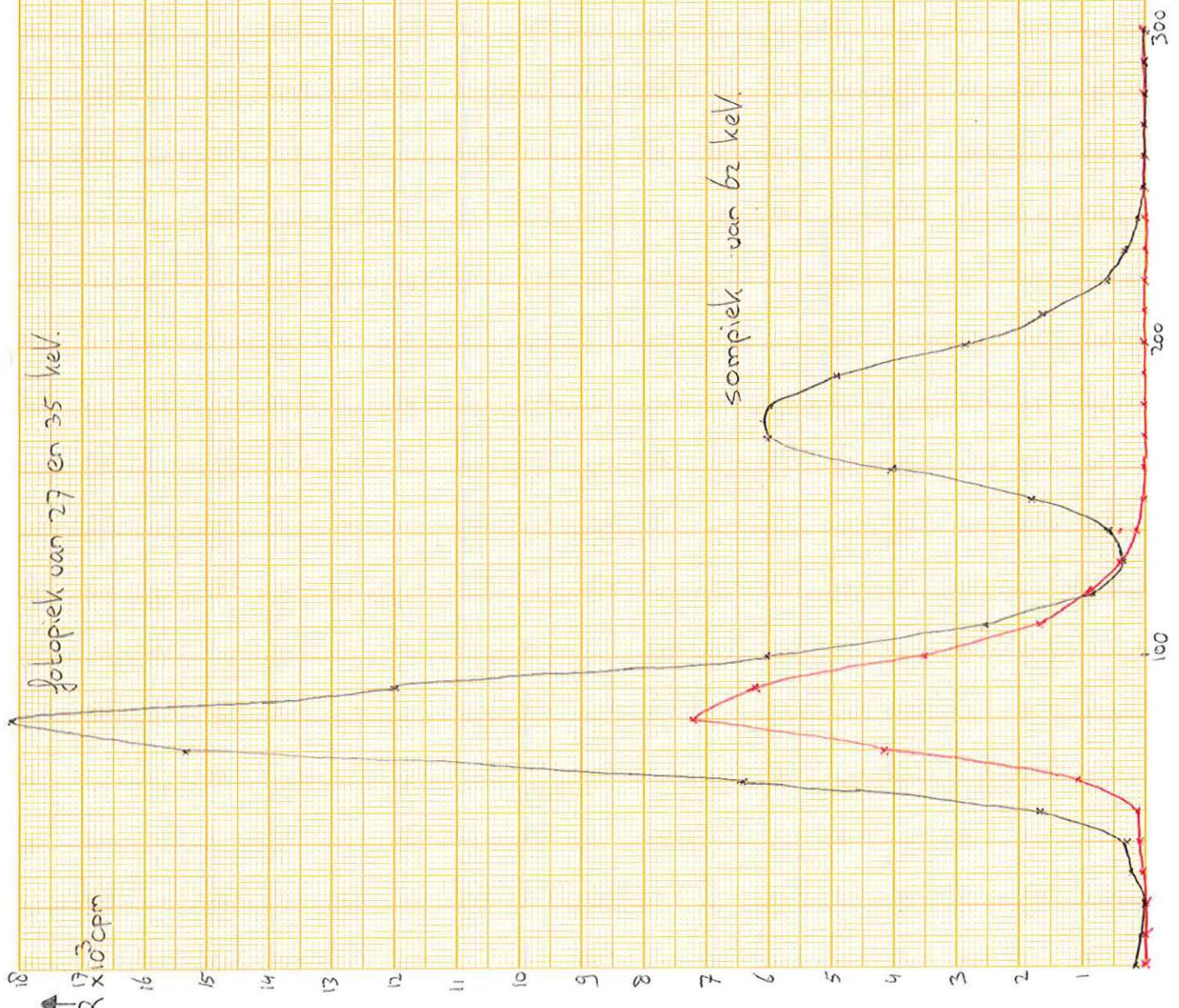
fotopiek van 27 en 35 keV.

R x 10³cpm

- spectrum van ^{125m}I
- attenuation: 0
- window: 20 schaaldelen
- werkspanning: 880V
- lower level: 10 schaaldelen
- spectrum van sim ^{125m}I ^{125m}I
- attenuation: 0
- window: 20 schaaldelen
- werkspanning: 880V

$R^{125mI} = 10 \times R^{125mI}$

PW4520 Philips AQA automatic gamma analyser.



sompiek van 62 keV.

base-line

03-08-83

^{57}Co

attenuation: 0
window: 20 schaaldelen
lower level: 10 schaaldelen
werkspanning: 800V

AGA automatic gamma
analyser
Philips PW 4520

Bijlage 1

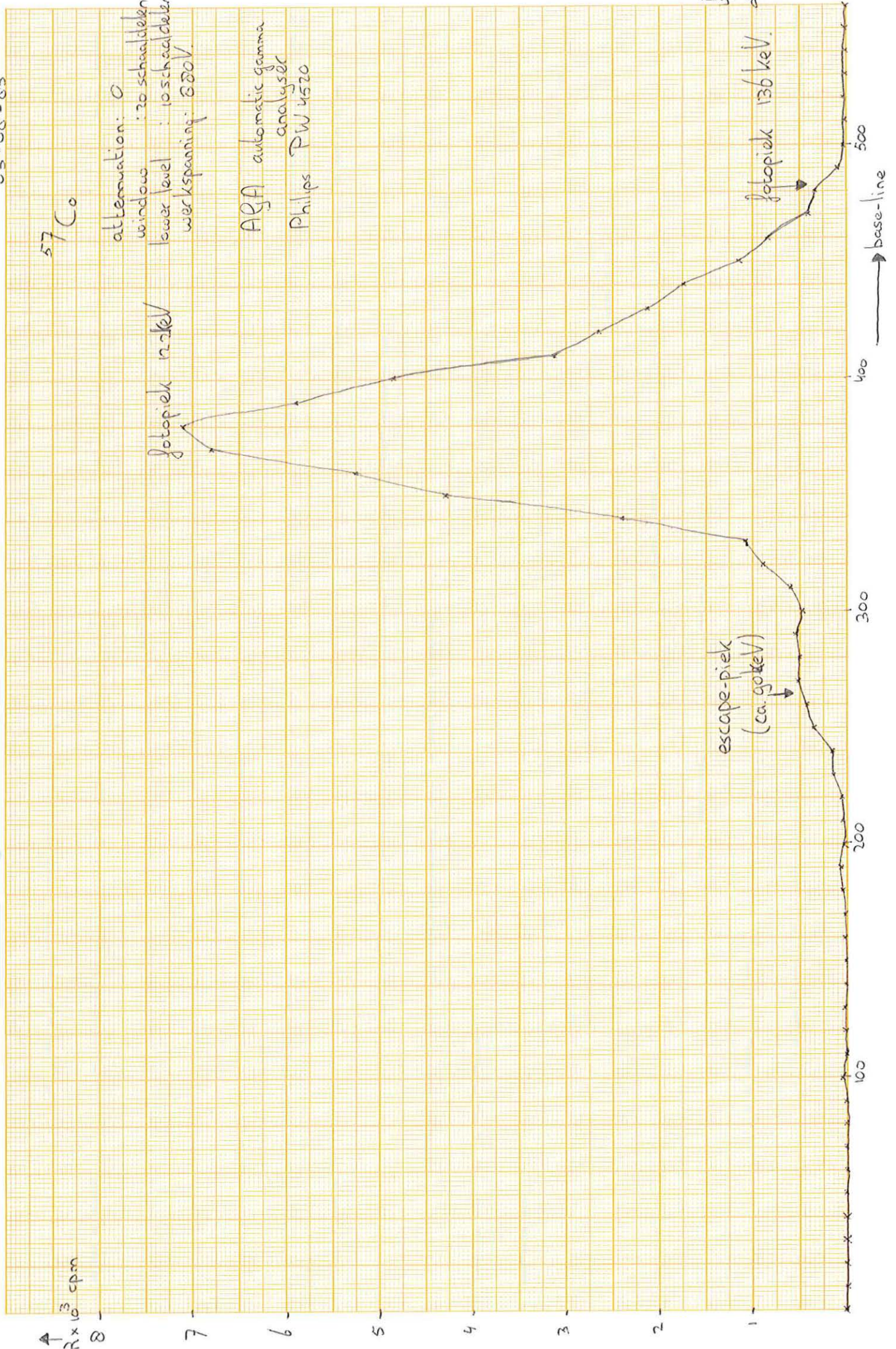
\uparrow
 2×10^3 cpm

fotopiek 12 keV

escape-piek
(ca. 90 keV)

fotopiek 136 keV

base-line



03-08-83

mengsel ^{125}I en ^{57}Co

attenuation: 0

window: 20 schaaldelen

lower level: 10 schaaldelen

werkspanning: 800 V

AEA automatic gamma analyser
Philips PW 4520

Bylage 1

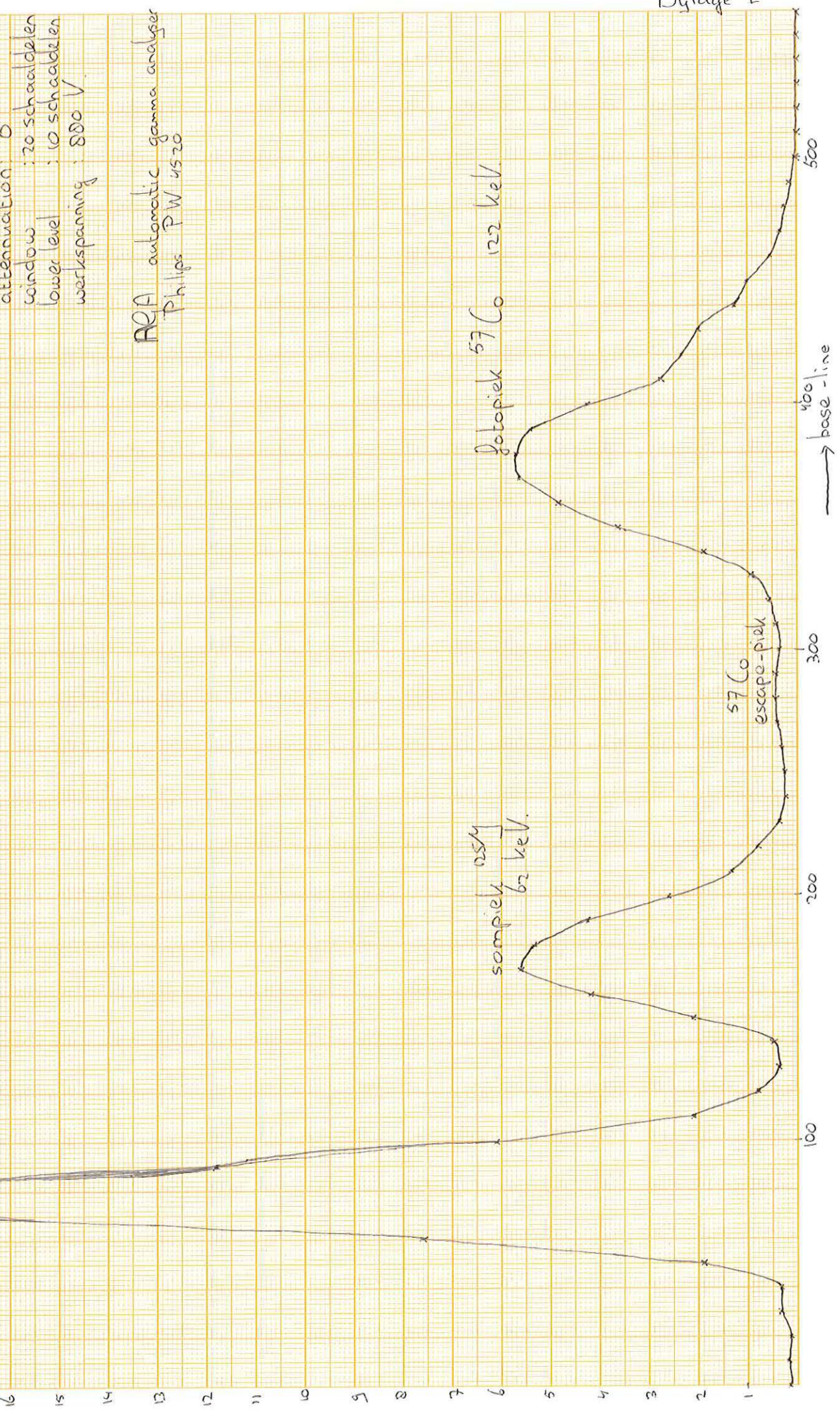
foto piek ^{125}I
27 en 35 keV

sompiek ^{57}Co
62 keV

foto piek ^{57}Co 122 keV

^{57}Co
escape-piek

\uparrow 17
R x 10³ cpm



base-line

03-08-83

137 Cs

$\uparrow R \times 10^3 \text{ cpm}$

window: 20 schaaldelen
 lower level: 10 schaaldelen
 werkspanning: 880 V
 - = attenuation $x=2^3=8$
 - = attenuation $x=2^4=16$
 - = attenuation $x=2^2=4$

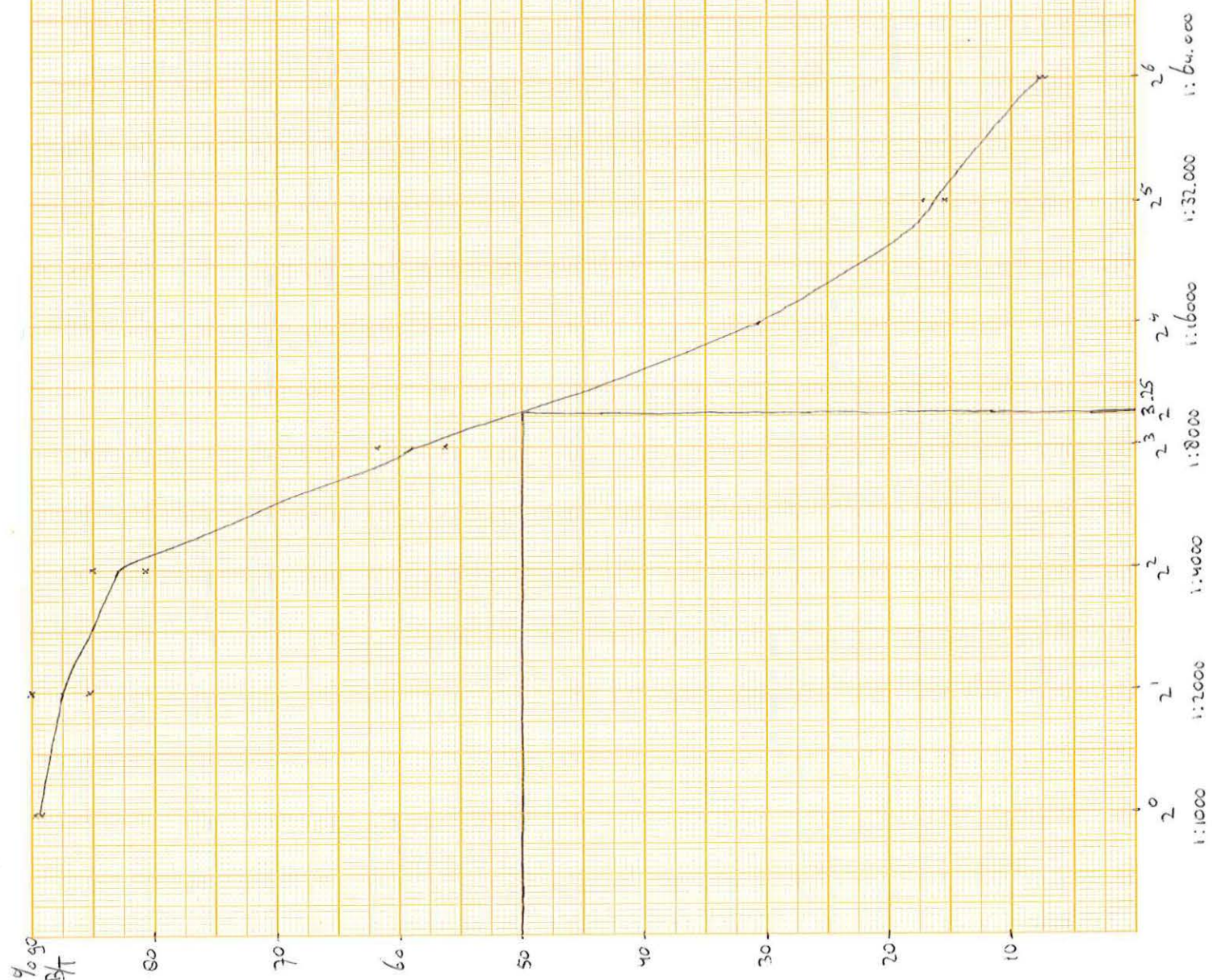
AGA automatic gamma analyser
 Philips PW 4570

Bijlage 1



Titratiecurve 170H proteïen
 50% binding: antiserumverduning $\frac{1000 \times 2^{3,25}}{1} = 1:9500$

antiserum verduning genomen van 1:8000





17-8-83

grafiek behorende bij bepaling van de gevoeligheid van een analyse



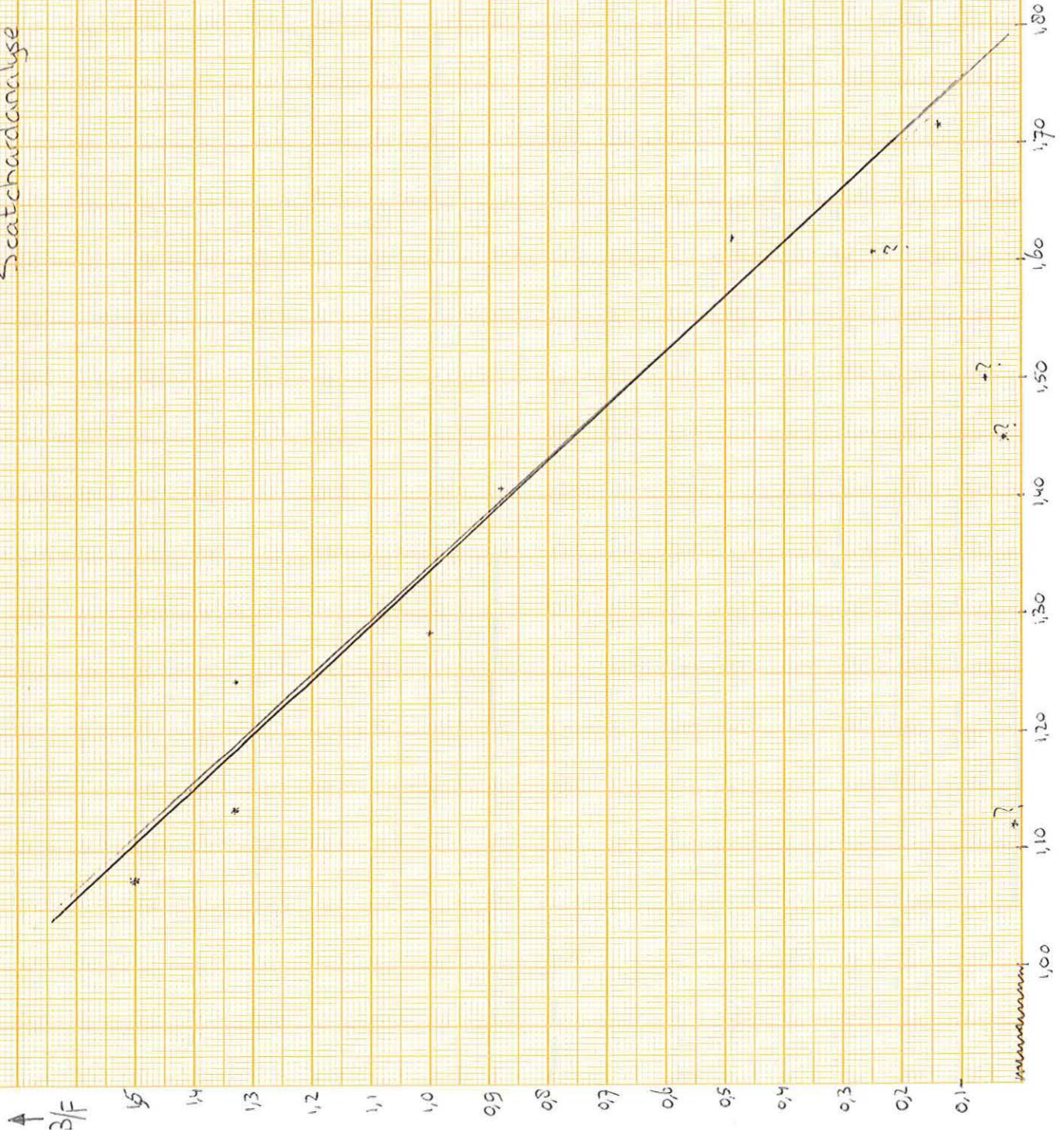
→ conc. progesteron in nmol/l

0.23

10-8-83

progesteron.

Scatchardanalyse

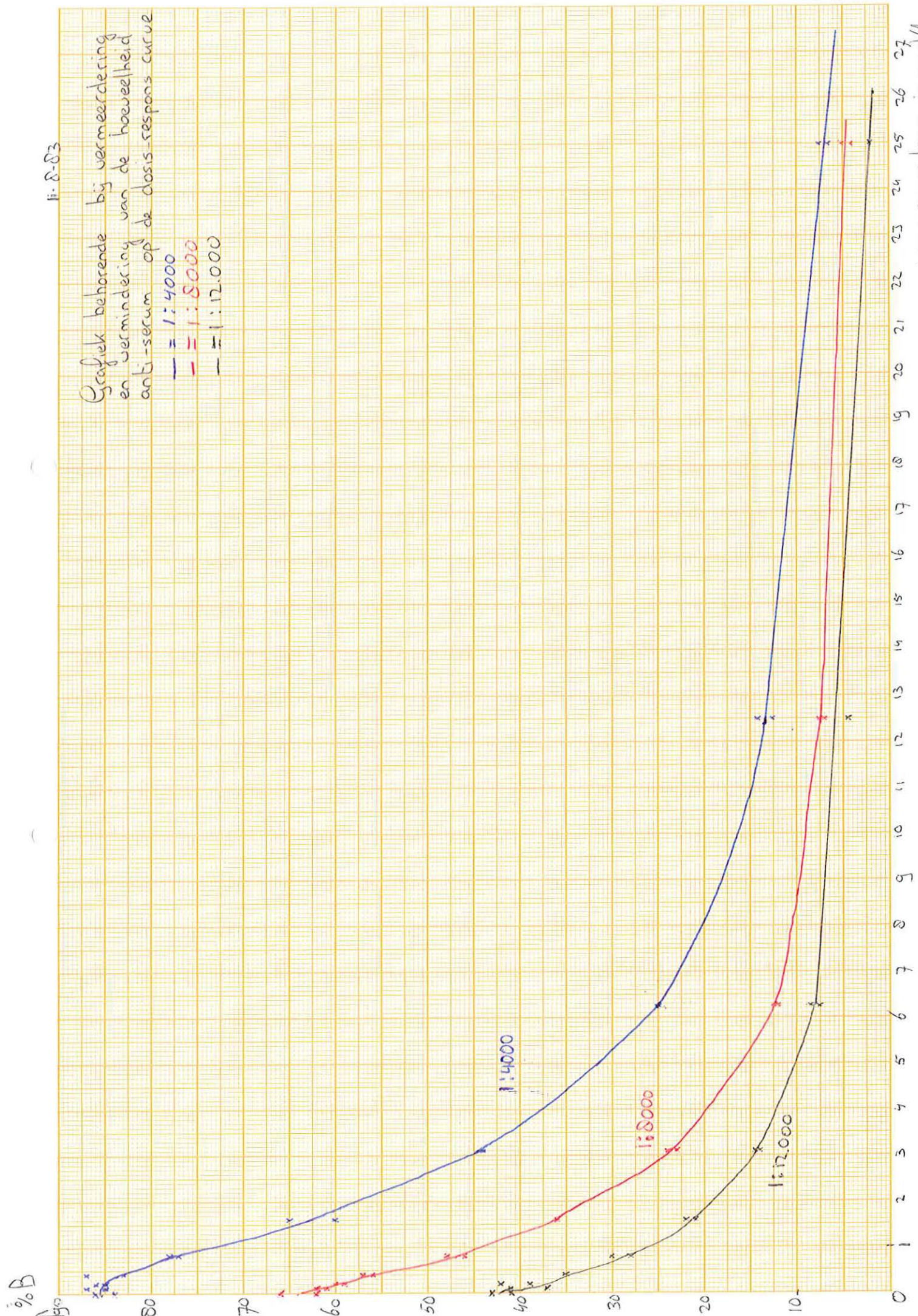


→ conc. $B \times 10^{-10}$ mol/l
Totaal hoeveelheid gebonden anticöen.

11-8-83

Grafiek behorende bij vermeerdering en vermindering van de hoeveelheid anti-serum op de dosis-respons curve

- = 1:4000
- = 1:8000
- = 1:12.000



→ conc. progesteron in nmol/l

$$\text{LOGIT} \left(\frac{d-0.01}{p} \right) = 1$$

