

Vývoj, validace a základní testování koncentrace Dickkopf-1 proteinu (DKK-1) v séru pomocí nové ELISA metody

M. Švesták, M. Karpíšek

ÚVOD

Dickkopf-1 (DKK-1) je solubilní protein, který působí jako inhibitor signální dráhy paratyriu a hraje pravděpodobně regulační roli při osteogenetických a osteoresorpčních procesech. V současné době je k dispozici několik komerčních diagnostických souprav na stanovení DKK-1, nicméně výsledky s měřením DKK-1 jsou rozporuplné (i při využití souprav identických výrobců).

Proto bylo cílem naší práce sestavení, validace a jednoduché klinické testování metody na stanovení DKK-1.

METODIKA

Byla navržena a sestavena kompetitivní (sendvičová) imunoanalytická metoda pro kvantitativní stanovení lidského DKK-1 v lidském séru. K ELISA stanovení jsme použili specifické polyklonální koží protilátky proti lidskému DKK-1 (Biovendor laboratorní medicína a.s.).

V mikrotitrační desce (Costar, High Binding) bylo vázáno 0,1 ml protilátky/1 jamku o koncentraci 1 µg/ml) v 0,1 M hydrogenuhličitanovém pufru pH 7,2 (následovala 12hodinová inkubace při 4 °C) a poté byla deska 1x promyta (Columbus washer, Tecan) pomocí TBS-Tw (0,05 M Tris-HCl; 0,15 M NaCl; pH 7,2; 0,05 % Tween 20). Nespecifická vazebná místa byla zablokována roztokem TBS (Tris Buffered Saline, pH 7,2), 4 % sacharózy a 0,5 % hovězího sérového albuminu (dávkováno 0,2 ml/jamku, inkubace 30 min při 25 °C). Po odsátí blokovacího roztoku bylo na desku dávkováno 0,1 ml příslušného standardu nebo 3x ředěného sérového vzorku (ředěno pomocí 1 % BSA, heterofilní blokovací reagentie Scantibodies) v 0,15 M PBS (0,12 M NaCl, 0,03 M fosforečnan sodný, pH 7,3) a všechna měření provedena v dubletu. Následně byla deska inkubována 1 hod při 25 °C.

Po 5násobném promytí desky promývacím roztokem (TBS, 0,05 % Tween 20, pH 7,2) bylo do všech

jamek desky dávkováno 0,1 ml biotinem značené koží polyklonální protilátky IgG (proces byl proveden soupravou od firmy Pierce) a deska opět inkubována 1 hod při 25 °C. Po opětovném 5násobném promytí desky bylo do všech jamek desky dávkováno 0,1 ml konjugátu streptavidin-křenuv peroxidáza (Amdex) a deska inkubována hod při 25 °C. Po promytí desky bylo do všech jamek desky dávkováno 0,1 ml substrátu TMB (1,2 mM tetrametylbendizin s obsahem 3 mM peroxidu vodíku, KPL) a reakční směs inkubována 10 min při 25 °C. Reakce byla zastavena přidávkem 0,2 M roztoku kyseliny sírové (0,1 ml/jamka) a vzniklé žluté zbarvení (produkt) bylo změřeno fotometricky při vlnové délce 450 nm (Biotek EL808). Intenzita žlutého zbarvení je přímo úměrná obsahu analytu ve vzorku. Koncentrace DKK-1 v neznámých vzorcích byly stanoveny z kalibrační křivky, která byla získána vynesním absorbancí standardů oproti jejich známé koncentraci. V testu byla použita sada standardů 4,0, 2,0, 1,0, 0,5, 0,25 a 0,125 µg/l v pufru s kaseinem, připravená nařazením rekombinantního lidského DKK-1.

Čistota proteinu byla analyzována elektroforézou v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS PAGE) a koncentrace rekombinantního DKK-1 byla stanovena pomocí metody s kyselinou bicinichoninovou (BCA metoda, Sigma-Aldrich).

Pro základní klinické testování byla vyšetřena skupina 64 zdravých osob v rámci preventivních prohlídek bez známek aktivního onemocnění. U všech sledovaných osob byly vyšetřeny sérové hodnoty DKK-1.

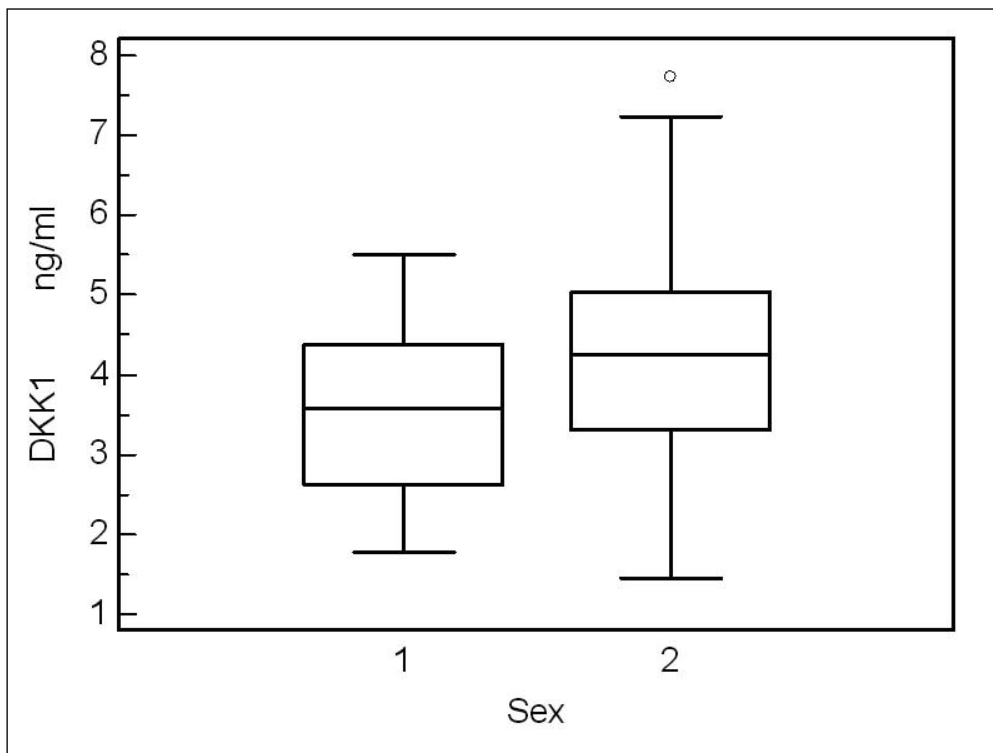
VÝSLEDKY

Pro ověření funkčnosti testu byla verifikována správnost a přesnost metody. Správnost metody byla ověřena metodou standardního přidavku a byla zjišťována výtěžnost, vyjádřená jako poměr získané/ očekávané hodnoty koncentrace DKK-1. Vzorky séra od 2 pacientů (o koncentraci DKK-1 2,19 µg/l, respektive 3,29 µg/l) byly obohaceny o +0,25, +0,5 a +1,0 µg /l rekombinantního DKK-1. Průměrná hodnota výtěžnosti byla 95 %. V testu linearity byly testovány dva vzorky séra (o koncentraci DKK-1 3,49 µg/l a 3,62 µg/l), které byly sériově ředěny ředícím roztokem, který obsahoval TBS a 0,01 % Thimerosal 10x, 20x, 40x a 80x, přičemž průměrná hodnota výtěžku byla 93 %.

Přesnost metody byla testována jako reprodukovatelnost výsledků a byla vyjádřena jako variační koeficient v sérii (n=8) i mezi sériemi měření (n=8). Hodnota mezilehlé přesnosti (variačního koeficientu - CV) byla ve všech případech < 10 %.

Mez stanovitelnosti metody představující nejnižší stanovitelnou koncentraci DKK-1, činila 0,01 µg/l (tato hodnota je vyjádřením koncentrace DKK-1 odpovídající absorbanci vypočítané podle vzorce: průměrná absorbance slepého vzorku (n=10) + 3x směrodatná odchylka průměru slepého vzorku).

Hodnoty DKK-1 v séru u zdravých osob (průměrný věk 49 roků, věk se nelišil u mužů a žen) se významně nelišily vzhledem k věku, přičemž ženy měly hodnoty DKK-1 významně vyšší (3,62 vs. 4,24, p=0,04), což odpovídalo recentním literárním údajům.



Graf č. 1 - Hodnoty DKK-1 u sledovaných zdravých osob dle pohlaví. Sex 1= muži. Sex 2=ženy.

ZÁVĚR

Lze konstatovat, že byla navržena, sestavena, validována a zavedena do klinické praxe nová metoda ELISA, kterou bychom dále chtěli využít ke klinickému testování u osob s poruchou kostní remodelace nebo postižením skeletu.

LITERATURA

U autora