

Untersuchungen über die Reaktionsparameter bei der radioimmunologischen Analyse des luteinisierenden Hormons (LH)

Von

J. Spona

Aus dem Hormonlaboratorium der I. Univ.-Frauenklinik Wien, Österreich

Mit 7 Abbildungen

(Eingegangen am 4. Dezember 1972)

Study on the Reaction Parameters of the Solid-Phase Radioimmunoassay of Luteinizing Hormone (LH)

The application of plastic test tubes allowed to reduce the time of analysis for the radioimmunoassay of luteinizing hormone (LH). This special technique is based on the fact that γ -globulins adhere to plastic surfaces. Plastic tubes were coated by incubation with antiserum, and this provided a simple way to perform the separation of bound and free tracer in a radioimmunoassay system. All variables of this assay (coating time, time of incubation with tracer and unknown samples, tracer and antiserum concentrations) were studied and resulted in a cut of analysis time to 5 hours. The disadvantage of using greater amounts of antiserum is compensated by the speed of this procedure. This system is valuable for biochemical and clinical studies.

Die Verwendung von Kunststoffgeräten erlaubt eine einfache Trennung von freiem und an den Antikörper gebundenem Tracer bei der radioimmunologischen Analyse des luteinisierenden Hormons (LH). Durch Inkubation wird eine bestimmte Menge von Antikörpern an Plastikteströhrchen gebunden. Die Untersuchung der einzelnen Reaktionsvariablen (Beschichtungsdauer, Inkubationszeit, Tracermenge und Antiserumverdünnung) des Analysenverfahrens ergab, daß eine radioimmunologische Untersuchung des LH innerhalb von 5—7 Stdn. möglich ist. Der Nachteil des großen Antiserumverbrauchs wird durch die Einfachheit und rasche Durchführung des Analysenverfahrens aufgehoben.

Bei der quantitativen Bestimmung des luteinisierenden Hormons (LH) versagen die üblichen Analysenmethoden, da die in Körperflüssigkeiten und in biochemischen in vitro-Systemen vorliegenden Hormonkonzentrationen unter den Erfassungsgrenzen liegen. Überdies liegt das

LH in einem so komplexen Proteingemisch vor, daß dies eine aufwendige Isolierung zur quantitativen Endpunktsbestimmung erforderlich machen würde. In den letzten Jahren wurde das Prinzip der radioimmunologischen Bestimmung¹ auch mehrfach für die quantitative Untersuchung des *LH* herangezogen²⁻¹⁵. Da alle bisher veröffentlichten radioimmunologischen *LH*-Methoden eine Analysendauer bis zu 5 Tagen beanspruchten, haben wir ein rasches Analysenverfahren entwickelt und kürzlich beschrieben¹⁶. Wir berichten nunmehr über die Reaktionsparameter in diesem System.

Material und Methoden

Hochgereinigtes humanes Choriongonadotropin (*HCG*, 36/F 3, 10 000 I. E./mg) wurde zur Immunisation von Kaninchen verwendet. ¹²⁵Jod (10 Ci ¹²⁵J/mg J, 200 mCi ¹²⁵J/ml) war von Farbwerke Hoechst AG, Frankfurt. Rinderserumalbumin (*RSA*) Fraktion V war von Sigma, St. Louis, Mo., und fötales Kälberserum (*FKS*) erhielten wir von Reheis Chemical Comp., Chicago, Ill. *RSA*-Diluens (0,01M-Phosphatpuffer pH 7,4, mit 0,5% *RSA*, 0,9% NaCl und 0,1% Neomycinsulfat) diente als Lösungsmittel für Standard, markiertes Hormon und unbekannte Proben. *LER* 907 mit einer biologischen Aktivität von 20 I. E. *FSH* und 48 I. E. *LH* pro mg wurde als *LH*-Standard verwendet. Die Jodierung von hochgereinigtem *LH* (*LH* IRC-2, -10, -12, -64, biologische Aktivität $5 \times \text{NIH-LH-S1}$) mit ¹²⁵J wurde, wie für das menschliche Placentolactogen von uns bereits beschrieben¹⁷, durchgeführt. Das mit ¹²⁵J markierte *LH* (Tracer) hatte eine spezifische Aktivität von 90 bis 150 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$. Das radioimmunologische Verfahren gliedert sich in folgende Analysenschritte:

1. Beschichten von Kunststoffröhrchen

Mehrere Kunststoffe wurden getestet. Polystyrol und Polyäthylen waren in ihren Eigenschaften gleichwertig. Das Beschichten von Inkubationsröhrchen (10 \times 75 mm) erfolgte durch Inkubation mit 1 ml einer Antiserumverdünnung (0,05M-Natriumcarbonat/bicarbonat-Puffer pH 9,6). Nach Ablauf der Reaktionszeit wurde abgesaugt und der Überschuß des Antiserums weggewaschen.

2. Inkubation mit Standard und Analysenproben

Zur Erstellung einer Eichkurve wurde mit je 1 ml einer *LH*-Standardverdünnung (0,25 bis 16 m. I. E. *LH*/*LER* 907 in *RSA*-Diluens mit 20% Kontrollserum) in den Röhrchen inkubiert, die mit Antiserum beschichtet waren. Zur Analyse von unbekanntem Proben aus Körperflüssigkeiten von Patienten bzw. aus in vitro-System bei biochemischen Studien wurde auf gleiche Weise inkubiert. ¹²⁵J-markiertes *LH* in 0,5 ml *RSA*-Diluens wurde zu Inkubationsbeginn oder nach Ablauf einer Präinkubationszeit hinzugefügt.

3. Bestimmung der an den Antikörper gebundenen Aktivität

Nach Ablauf der Inkubationsdauer wurde das Medium abgesaugt und die Inkubationsröhrchen mehrmals mit Wasser gewaschen. Die an den Antikörper gebundene Radioaktivität wurde durch Messen der Inkubationsröhrchen in einem Packard Auto-Gamma-Spektrometer, Modell 5219,

bestimmt. Hierauf konnte eine Standardkurve gezeichnet werden und davon die unbekanntenen Proben abgelesen werden. Die Auswertung der Daten wurde auch im späteren Verlauf der Untersuchungen mit Hilfe eines Computerprogramms durchgeführt.

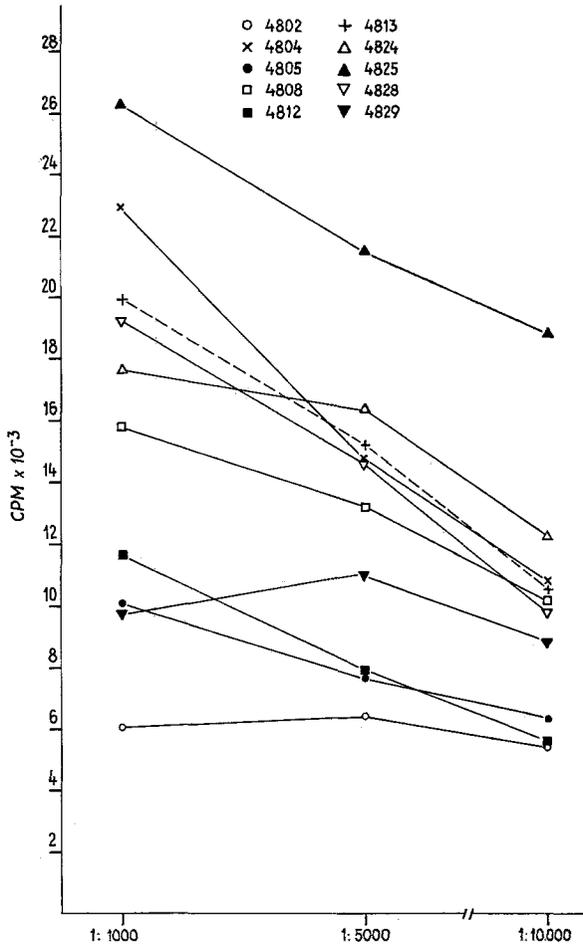


Abb. 1. Bindungskapazität verschiedener Antiseren bei Verdünnungen 1:1000, 1:5000 und 1:10000. Beschichtungsdauer 2 Stdn. bei Zimmer-temp. Inkubation mit 100 000 cpm Tracer 12 Stdn. bei 4 °C

Ergebnisse

Die Austestung der Bindungsfähigkeit verschiedener Antiseren gegen *LH* ist in Abb. 1 wiedergegeben. Für das Antiserum mit der größten Bindungskapazität (AS 4825) wurde der Titer bei konstanter Inkuba-

tionszeit genau bestimmt (Abb. 2). Dieses Antiserum ergab bei einer Verdünnung von 1 : 10 000 nach 5 Min. Inkubationszeit bei Zimmertemp. zum Beschichten der Polystyrolröhrchen mit Antiserum bereits eine Bindung von 4000 cpm, wenn die so beschichteten Röhrchen bei 37 °C

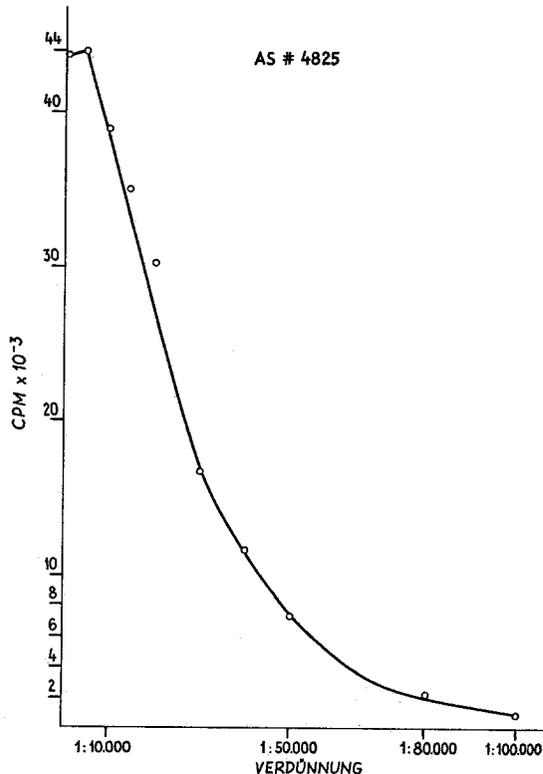


Abb. 2. Titerbestimmung des Antiserums mit der besten Bindungsfähigkeit (AS 4825). Beschichtungsdauer 2 Stdn., Zimmertemp. Inkubationsdauer 12 Stdn. bei 4 °C mit 100 000 cpm Tracer

2½ Stdn. mit *RSA*-Diluens und anschließend 2½ Stdn. mit Tracer inkubiert wurden. Mit zunehmender Dauer der Inkubation zur Beschichtung mit Antikörper nahm die gebundene Radioaktivität zu und erreichte nach 2 Stdn. einen Sättigungswert (Abb. 3).

Die Analyse der Standardkurven, die bei der Inkubation verschiedener Konzentrationen des *LER* 907 während 18 Stdn. unter sonst konstanten Bedingungen bei 4 und 37 °C erhalten wurden, zeigte, daß bei der tieferen Temperatur eine größere Genauigkeit und Empfindlichkeit des Systems erreicht wird (Abb. 4). Die Standardkurve konnte mit

B_0/B (B_0 = Radioaktivität bei Standardkonzentration gleich Null, B = Radioaktivität bei jeweiliger Standardkonzentration) linearisiert werden, und die günstigere Standardkurve wird durch die größere Steigung bei der B_0/B -Transformation ersichtlich (Abb. 4).

Abb. 5 zeigt, daß eine Inkubationsdauer von 5 Stdn. für Tracer und

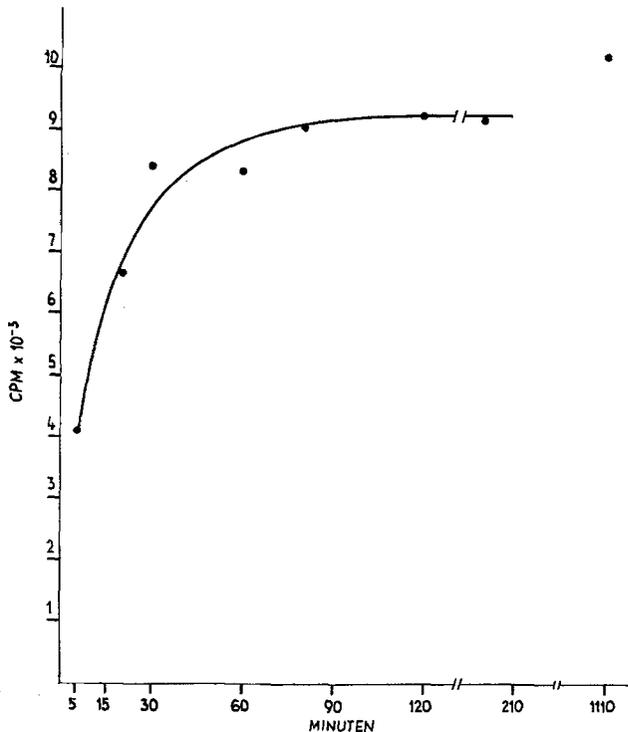


Abb. 3. Abhängigkeit der an den Antikörper gebundenen Radioaktivität von der Beschichtungsdauer, AS 4825, 1 : 10 000. Inkubationsdauer 5 Stdn. bei 37 °C mit 100 000 cpm Tracer

Standard bei 37 °C bereits eine brauchbare Standardkurve liefert. Durch Präinkubation von 2½ Stdn. ohne Tracer und nachfolgende Inkubation von 2½ Stdn. mit markiertem Hormon verbessert sich die Genauigkeit und Empfindlichkeit der Standardkurve. Dies zeigt die Linearisierung besonders deutlich (Abb. 5).

Die Untersuchungsergebnisse über verschiedene Antiserumverdünnungen (1 : 1000, 1 : 10 000, 1 : 30 000) beim Beschichtungsvorgang und verschiedene Radioaktivitäten (50 000, 100 000, 150 000 cpm) beim Inkubationsvorgang sind in Abb. 6 zusammengefaßt. Daraus ist ersicht-

lich, daß mit 50 000 cpm bei einer Antiserumverdünnung von 1 : 10 000 nur ein geringer B_0 -Wert (10 500 cpm) erhalten wurde, während bei einer Traceraktivität 100 000 cpm bereits mehr als 20 000 cpm gebunden

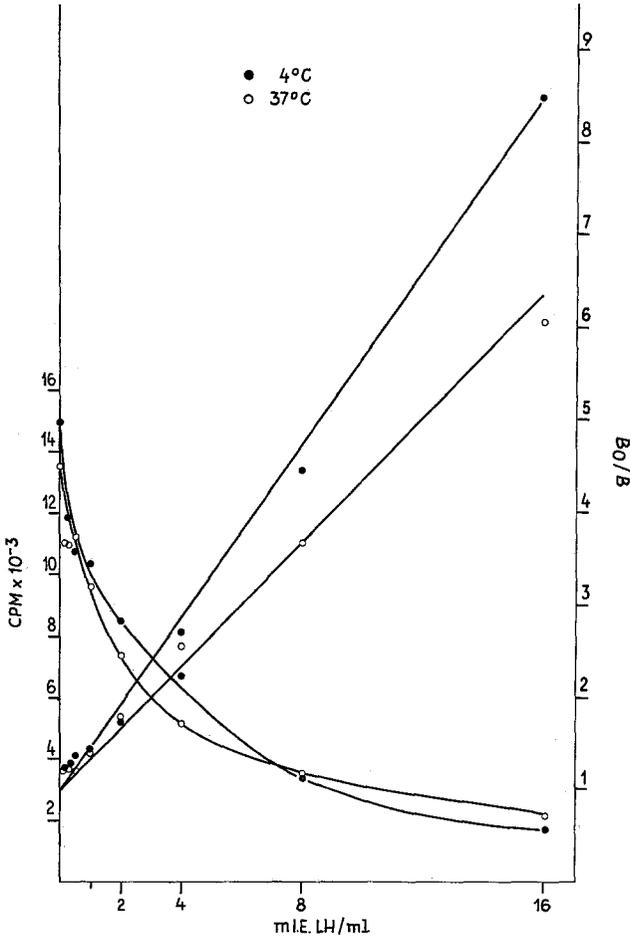


Abb. 4. Abhängigkeit der Standardkurve von der Inkubationstemperatur (4 °C, 37 °C). Beschichtungsdauer 2 Stdn., Zimmertemp., AS 4825, 1 : 10 000. Inkubationsdauer 18 Stdn. bei 4 bzw. 37 °C mit 100 000 cpm Tracer. Mit B_0/B wurde eine Linearisierung der Standardkurven erhalten. B_0 ist die gebundene Radioaktivität bei der Standardkonzentration Null. B ist die Radioaktivität bei der jeweiligen Standardkonzentration

wurden. Eine Erhöhung der Radioaktivität des Tracers auf 150 000 cpm bei gleichbleibender Antiserumverdünnung bewirkte, daß B_0 nur mehr

geringfügig zunahm. Die Steigung der Standardkurve nahm jedoch ab (Abb. 6).

Unter Verwendung einer Antiserumverdünnung von 1:1000 bei

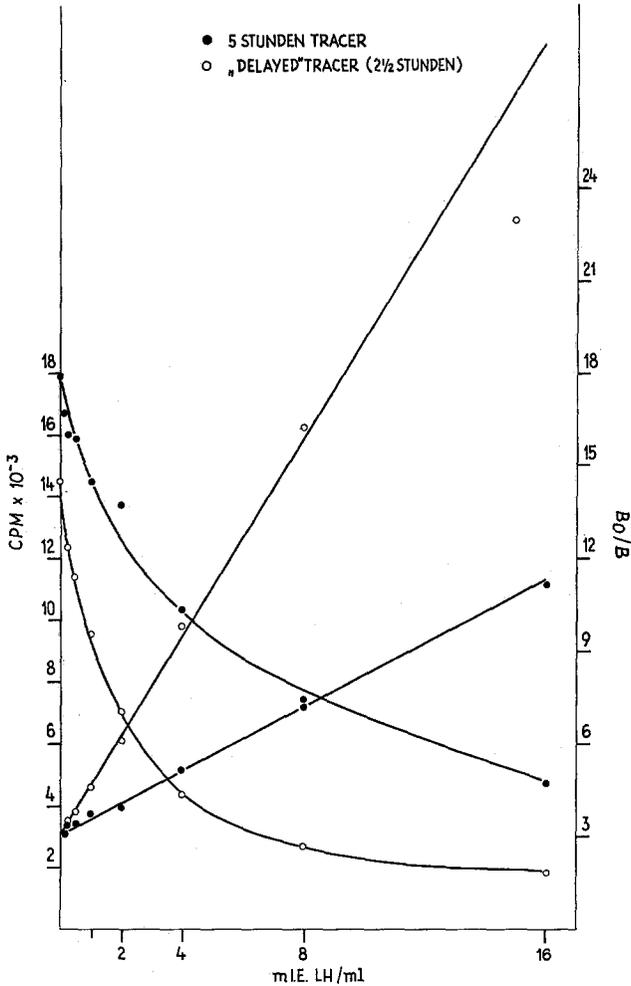


Abb. 5. Standardkurven mit und ohne Präinkubation. Beschichtungsdauer 2 Stdn., Zimmertemp. mit AS 4825, 1:10 000. Inkubationsdauer 5 Stdn. bzw. 2½ Stdn. nach einer Präinkubation von 2½ Stdn. ohne Tracer („delayed tracer“) mit 100 000 cpm Tracer bei 37 °C. Linearisierung mit B_0/B

einer Traceraktivität von 100 000 cpm steigt B_0 auf 28 000 cpm. B_0 fällt bei Konstanthaltung der Traceraktivität und Erhöhung der Anti-

serumverdünnung auf 1 : 30 000 auf 8000 cpm ab (Abb. 6). Die Spezifität unseres Systems wurde getestet und keine Kreuzreaktion gegen *FSH*, *STH* (Abb. 7) und andere Polypeptidhormone gefunden.

Diskussion

Die radioimmunologische Analyse von Substanzen, die als Antigene wirken und gegen die Antiseren produziert werden können, beruht auf der Tatsache, daß unmarkiertes Material mit radioaktiv markiertem Material (Tracer) um Bindungsstellen am spezifischen Antikörper konkurrenziert¹. Die an den Antikörper gebundene Radioaktivität läßt sich mit Hilfe einer Eichkurve in Relation zur Konzentration der betreffenden Substanz setzen. Eine kritische Stufe bei solchen radioimmunologischen Verfahren ist die Abtrennung des freien Tracers von dem Tracer, der an den Antikörper gebunden wurde. Die Radioaktivität des nicht umgesetzten Tracers oder des Antigen—Antikörper-Komplexes kann hierauf bestimmt werden.

Die lange Analysendauer aller bisher beschriebenen radioimmunologischen Systeme zur quantitativen Analyse des *LH*¹⁸ erlaubt es nicht, auf Grund des Analysenergebnisses kurzfristige Entscheidungen bei biochemischen Projekten bzw. klinischen Studien zu treffen. Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen aller Reaktionsparameter erlaubten die Analysendauer auf 5 Std. zu reduzieren¹⁶. Die Trennung des freien vom gebundenen Tracer wurde hier mit Hilfe einer festen Phase (Polystyrol) durchgeführt. Sie beruht auf der Tatsache, daß γ -Globuline an Kunststoffoberflächen adsorbiert werden können¹⁹. Im ersten Schritt des Verfahrens muß die Fähigkeit von Antiseren zum Beschichten von Kunststoffen und die Bindungskapazität ausgetestet werden (Abb. 1). Interessant war unsere Beobachtung, daß Antiseren mit genügend hohem Titer in flüssig—flüssig-Systemen einen geringen Titer in unserem fest—flüssig-System zeigten. Wir haben dafür zur Zeit keine Erklärung. Das Antiserum mit der besten Bindungsfähigkeit wird ausgewählt und jene Verdünnung gewählt, die mindestens 10 000 cpm Tracer bindet, wenn mit 100 000 cpm radioaktiv markiertem Hormon inkubiert wird (Abb. 2). Die Beschichtung mit γ -Globulinen erfolgte durch Inkubation der betreffenden Antiserumverdünnung in Polystyrolröhrchen bei Zimmertemp. Unsere Studien zeigten, daß diese Reaktion sehr rasch verläuft, da bereits nach 5 Min. 4000 cpm gebunden werden können. Nach 2 Std. kommt es zu einer Sättigung mit einer maximalen Bindung von 9000 cpm (Abb. 3). Da die nachfolgende Analyse der einzelnen Standardkurven nach den in Abb. 3 wiedergegebenen Beschichtungszeiten die beste Eichkurve für 2 Std. ergab, wurde die Beschichtung nunmehr auf diese Zeit standardisiert.

Unsere Untersuchungen zeigten, daß mit diesem analytischen Ver-

fahren bereits nach 18 Stdn. Inkubationsdauer von bekannten LH-Konzentrationen mit Tracer bei 4 °C eine geeignete Standardkurve erhalten wird (Abb. 4). Die Genauigkeit und Nachweisgrenze des Systems wird

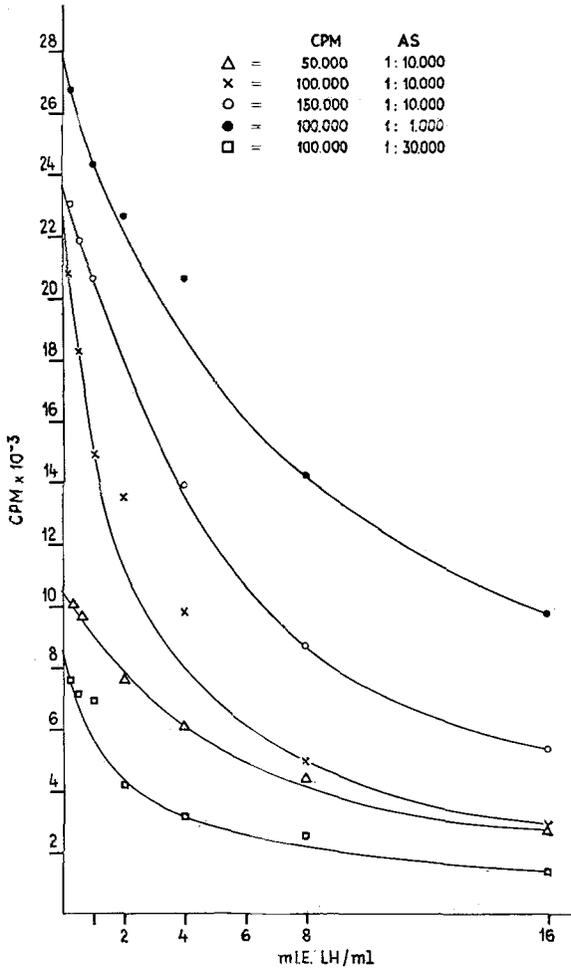
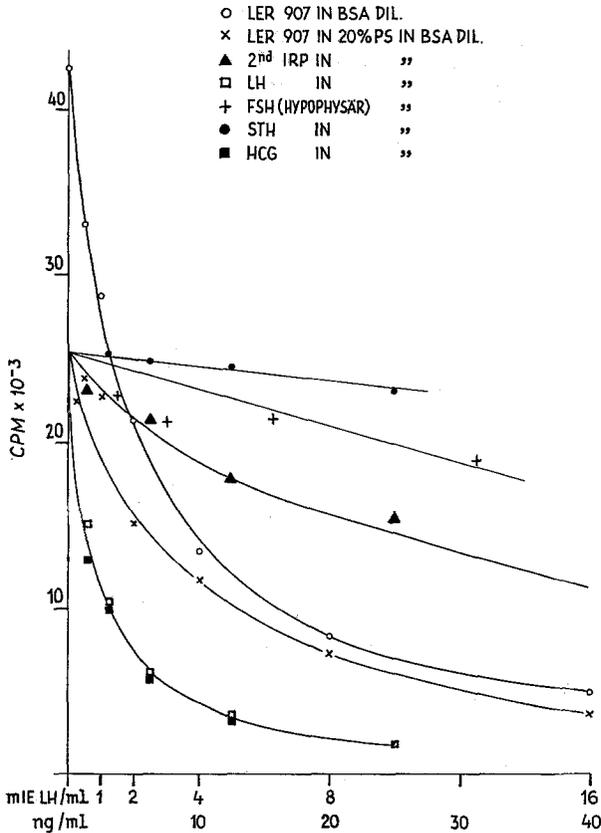


Abb. 6. Einfluß von Antiserumkonzentration (AS 4825) und Radioaktivität des Tracers auf die Standardkurve, Inkubationsdauer 5 Stdn. (2 ½ Stdn. Präinkubation) bei 37 °C. Beschichtungsdauer 2 Stdn., Zimmertemp.

durch Inkubation bei 37 °C etwas verschlechtert. Am besten läßt sich dies durch eine B_0/B -Transformation zeigen (Abb. 4). Diese Linearisierung (Abb. 4) erlaubt auch eine einfachere Computerauswertung der Resultate.

Nachdem eine Inkubation bei 37 °C möglich war, versuchten wir eine Kurzinkubation von 5 Stdn. Empfindlichkeit und Genauigkeit konnten durch eine Präinkubation von 2½ Stdn. ohne Tracer mit einer nachfolgenden Inkubation mit Tracer wesentlich verbessert werden (Abb. 5). Inkubation der Standardkurve und der unbekanntenen Proben



wurde auf diese Zeit standardisiert. Die geringfügige Abnahme der cpm-Zahl von B_0 wirkte sich auf das System nicht aus. Da die untere Nachweisgrenze sowohl von der Antikörpermenge als auch von der Tracermenge abhängt, ergab unsere Untersuchung dieser beiden Parameter, daß bei Veränderungen dieser Versuchsbedingungen Standardkurven mit unterschiedlichen Steigungen resultierten (Abb. 6). Eine Antiserumverdünnung von 1 : 10 000 und 100 000 cpm des Tracers ergab für das verwendete Antiserum (AS 4825) die günstigsten Reaktions-

bedingungen, d. h. Empfindlichkeit und Genauigkeit waren bei diesen Bedingungen optimal. Das Verhältnis Tracer zu Antikörpermenge muß so eingestellt sein, daß die Tracermenge im Überschuß vorliegt. Da unser System keine Kreuzreaktionen gegen *FSH*, *STH* (Abb. 7) und andere

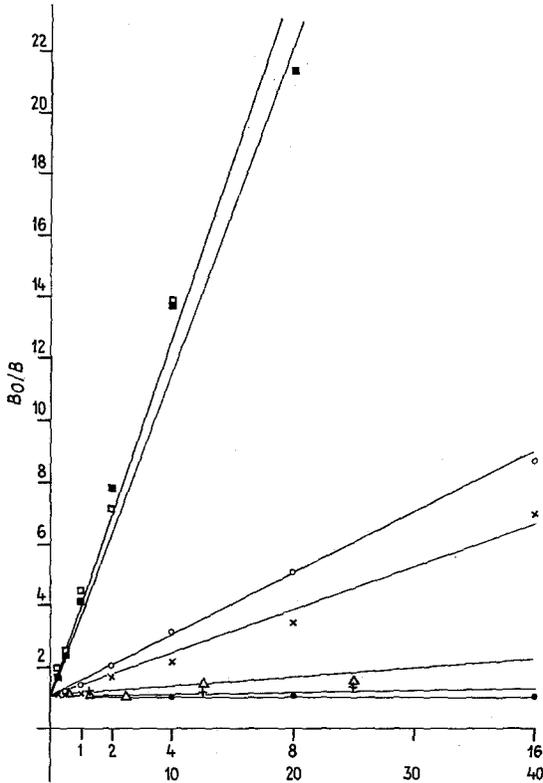


Abb. 7 b

Abb. 7. Test des Antiserums auf Kreuzreaktionen. Die Spezifität des Systems wird durch die B_0/B -Linearisierung noch besser dargestellt. Beschichtungsdauer 2 Std., Zimmertemp. mit AS 4825, 1 : 10 000, 5 Std. Gesamtdauer der Inkubation ($2\frac{1}{2}$ Std. Präinkubation) mit 100 000 cpm Tracer bei 37°C

Proteinhormone zeigt, läßt es sich zur spezifischen Bestimmung des LH bei klinischen und biochemischen Projekten verwenden.

Durch die Verwendung einer festen Phase zur Trennung des freien vom gebundenen Tracer wurde eine vereinfachte Handhabung des Systems erreicht. Überdies ergaben die vorliegenden Untersuchungen, daß bei diesem System eine raschere Gleichgewichtseinstellung erzielt werden konnte. Die Analysendauer beträgt bei dem vorliegenden Verfahren nur einen Bruchteil der früheren Methoden. Überdies können

vorbeschichtete Inkubationsröhrchen bei Bedarf zur Analyse eingesetzt werden. Der Nachteil, daß man große Mengen des Antiserums verbraucht, wird durch die Einfachheit und kurze Analysendauer aufgehoben.

Wir danken Frau Dr. *A. S. Hartree*, daß sie uns hochgereinigtes *LH* zur Verfügung stellte. Dem NIH verdanken wir den Standard *LER 907*. Hochgereinigtes *HCG* verdanken wir Herrn Dr. *K. Lübke*, und einige Antiseren erhielten wir von Herrn Dr. *R. von Berswordt-Wallrabe*. Wir danken Frau *E. Neustädtl*, FrI. *H. Otto*, FrI. *G. Blaha*, FrI. *M. Klampfer*, FrI. *E. Meisinger* und FrI. *E. Schreiner* für ausgezeichnete technische Mitarbeit an diesem Projekt.

Literatur

- ¹ *S. A. Berson* und *R. S. Yalow*, *Clin. chim. Acta* **22**, 51 (1968).
- ² *K. Thomas* und *J. Ferin*, *J. Clin. Endocr.* **28**, 1667 (1968).
- ³ *W. D. Odell*, *P. L. Rayford* und *G. T. Ross*, *J. Lab. Clin. Med.* **70**, 973 (1967).
- ⁴ *L. Wide*, in: *Karolinska Symposia on Research Methods in Reproductive Endocrinology. Ist Symposium (E. Diczfalusy und A. Diczfalusy, Hrsg.)*, S. 207. Kopenhagen: Bogtrykkeriet Forum. 1969.
- ⁵ *C. Faiman* und *R. J. Ryan*, *Proc. Soc. exper. Biol.* **125**, 1130 (1967).
- ⁶ *T. Aono*, *D. P. Goldstein*, *M. L. Taymor* und *K. Dolch*, *Amer. J. Obstet. Gynec.* **98**, 996 (1967).
- ⁷ *K. D. Bagshawe*, *C. E. Wilde* und *A. H. Orr*, *Lancet* **1**, 1118 (1966).
- ⁸ *K. J. Catt*, *H. D. Niall*, *G. W. Tregear* und *H. G. Burger*, *J. Clin. Endocr. Metab.* **28**, 121 (1963).
- ⁹ *K. J. Catt*, in: *Karolinska Symposia on Research Methods in Reproductive Endocrinology. Ist Symposium (E. Diczfalusy und A. Diczfalusy, Hrsg.)*, S. 222. Kopenhagen: Bogtrykkeriet Forum. 1969.
- ¹⁰ *P. Franchimont*, *Ann. Endocrin.* **27**, 273 (1966).
- ¹¹ *A. R. Midgley*, *Endocrin.* **79**, 10 (1966).
- ¹² *W. D. Odell*, *G. T. Ross* und *P. L. Rayford*, *Metabolism* **15**, 287 (1966).
- ¹³ *A. Pala*, *Riv. Ostet. Ginec.* **23**, 155 (1968).
- ¹⁴ *D. S. Schalch*, *A. F. Parlow*, *R. C. Boon*, *S. Reichlin* und *L. A. Lee*, *J. Clin. Invest.* **47**, 665 (1968).
- ¹⁵ *C. E. Wilde*, *A. H. Orr* und *K. D. Bagshawe*, *J. Endocrin.* **37**, 23 (1967).
- ¹⁶ *J. Spona*, *Z. Anal. Chem.* **259**, 223 (1972).
- ¹⁷ *J. Spona*, *Z. Immun. Forsch.* **143**, 192 (1972).
- ¹⁸ *A. R. Midgley, Jr.*, *Bibl. Reprod.* **19**, 305 (1972).
- ¹⁹ *K. J. Catt* und *G. W. Tregear*, *Science* **158**, 1570 (1967).