

Afdeling Spectroscopie/Electrochemie/
Radioactiviteit/Hormonen 1985-12-23
RAPPORT 86.30 Pr.nr. 505.0740
Onderwerp: Onderzoek naar de toepassing
van de DELFIA-techniek als
screeningsmethode. Interim
rapport.

Verzendlijst: directeur, directie VKA, sektorhoofd, afdeling SERH,
bibliotheek (2x), projectleider, projektbeheer,
circulatie.

RAPPORT 86.30

Pr.nr. 505.0740

Projekt: Ontwikkeling van immunochemische bepalingsmethoden (algemeen).

Onderwerp: Onderzoek naar de toepassing van de DELFIA-techniek als screeningsmethode. Interim rapport.

Doel:

Onderzoek naar de toepassing van de DELFIA-techniek als screeningsmethode voor 17β -estradiol in urine.

Samenvatting:


In dit rapport zijn de bevindingen weergegeven met betrekking tot de toepasbaarheid van de Delfia techniek. De screening van een tweetal steroiden, namelijk cortisol en 17β -estradiol in respectievelijk serum en urine, zijn m.b.v. de Delfia methode bekeken.

Conclusie:

Cortisol is, met het door LKB Wallac geleverde kit en voorschrift, te bepalen in serum m.b.v. de Delfia-techniek.

Het bepalen van 17β -estradiol, in een zelf ontwikkelde methode, in urine ondervindt storing van matrix invloeden. De absolute detectiegrens voor 17β -estradiol bedraagt 1 pg. De relatieve detectiegrens bedraagt 10 pg/ml (10 ppt).

Verantwoordelijk : dr W.G. de Ruig  

Medewerker(s)/Samensteller(s): G.D. van Bruchem, Q. Vos 

Projectleider : drs P.H.U. de Vries

1. Inleiding

De afgelopen jaren is het aantal gebieden, waarop immunologische bepalingmethoden zijn toegepast, snel gegroeid. Eigenschappen als een grote selectiviteit en lage detectiegrenzen maken ook een toepassing in de residubepaling interessant. Naast de Ria (Radio-immuno-assay), die voor de detectie gebruik maakt van radioactief gelabeld materiaal, de Elisa (Enzyme-linked-immuno-sorbent-assay), waarbij enzyme-labeling spectroscopische detectie van het gevormde produkt mogelijk maakt, is de Fia (Fluorescence-immuno-assay), waarbij met fluorescerende labels gewerkt wordt, de meest gebruikte techniek.

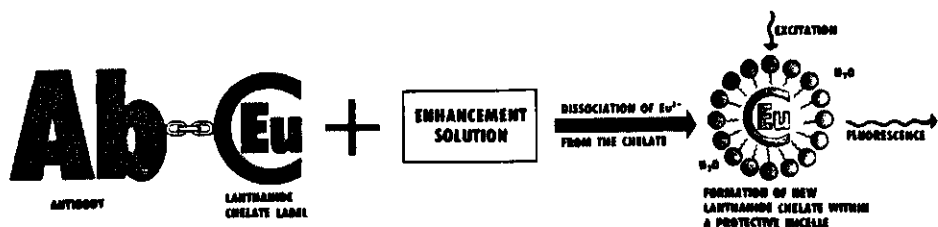
De Firma LKB bracht onlangs de Delfia (Dissociation-enhanced-lanthanide-fluoro-immuno-assay) op de markt, die naast een t.o.v. de Fia verbeterde analysemethode een uitstekende instrumentatie en gegevensverwerking biedt. Met het oog op een toekomstig gebruik van de Delfia als methode voor de screening op steroiden is de analyse van een 2-tal steroiden, β -estradiol en cortisol in resp. urine en serum bekeken.

2. Achtergronden Delfia

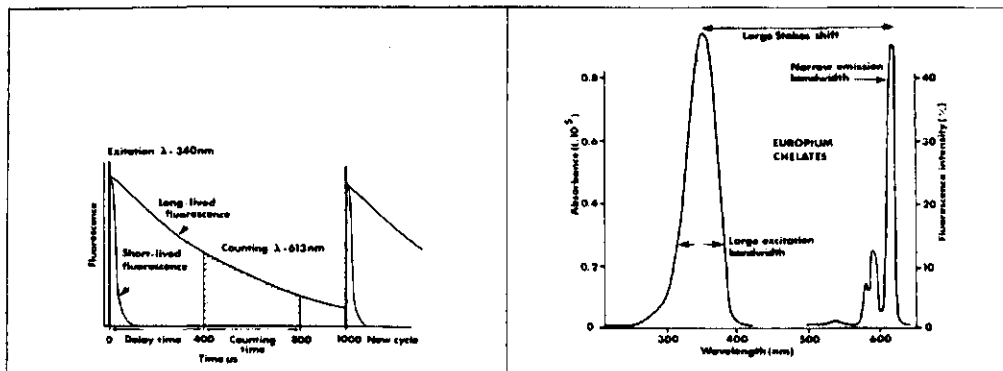
De vroegere Fia-methoden ondervonden de nodige hinder van storende bestanddelen uit de achtergrond op de te meten fluorescentie.

Toepassing van een solid-phase immuno-assay onderdrukt storing vanuit de matrix voldoende, maar maakt gebruik van materialen, die zelf ook fluoresceren. LKB ontwikkelde om de invloed van de achtergrondfluorescentie tegen te gaan een antilichaamlabelling met een fluorescerende stof met een lange fluorescentie-halfwaarde tijd. Gekozen werd voor het Europiumion, dat in EDTA geligeerd aan de antilichamen werd gekoppeld.

In het EDTA gebonden fluoresceert het Europium zwak, maar toevoeging van een "enhancement solution" brengt het Europium in oplossing alwaar het een sterk fluorescerend complex vormt.

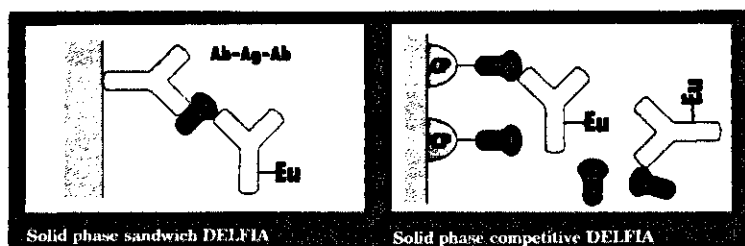


Dit complex heeft een lange fluorescentie halfwaardetijd (10.000 usec), zodat na het aanslaan van de opgeloste moleculen, gedurende de tijd, dat de achtergrond meefluoresceert, gewacht kan worden, alvorens de emissie te meten.



Afhankelijk van de grootte van het te meten molecule zijn met de Delfia een tweetal methoden uitvoerbaar:

- voor grote moleculen, waaraan meer dan 1 antilichaam molecuul tegelijk kan binden, de solid-phase-sandwich immuno assay
- voor kleine moleculen; waarop slechts plaats is voor de binding van 1 antilichaam molecuul, de competitieve solid-phase immuno assay



Doel van de experimenten was om een indruk te krijgen van de methode m.b.v. een door de fabrikant geleverde cortisol-kit en van de toepassing van de Delfia in zelf te ontwikkelen methoden. Voor dit laatste is geëxperimenteerd met β -estradiol.

3. Apparatuur

- Arcus 1230 Fluorometer, LKB Wallac
- Disk drive unit, LKB Wallac
- Diskette met de benodigde Soft Ware, LKB Wallac

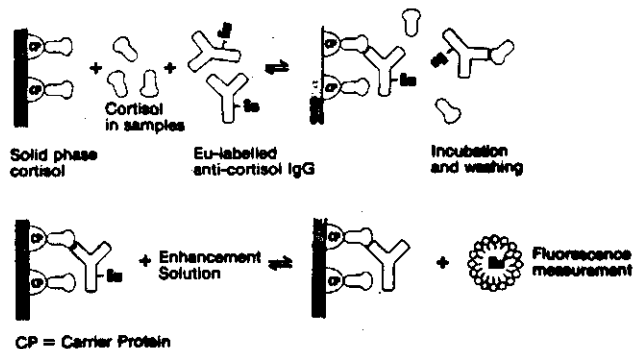
- Printer, LKB Wallac
- Was/afzuig unit, LKB Wallac
- Vari-shaker microtiter, Dynatech.

4. Experimenten met de cortisol-kit

Gebruik werd gemaakt van een door LKB geleverde cortisol-kit, die bestond uit:

- met een cortisolconjugaat gecoate strips
- cortisol standaarden voor het opstellen van een ijklijn
- FCA assay buffer, voor het oplossen van standaarden en antilichamen
- enhancement solution
- wasvloeistof

4.1 Principe van de bepaling



4.2 Werkwijze

De methode werd uitgevoerd volgens de door de fabrikant bijgeleverde instructies.

4.3 Resultaten

Het cortisol gehalte van sera van met 17- β -estradiol behandelde kalveren is bepaald.

Bijlage no. 1 geeft de gegevensverwerking van de DELFIA weer.

- Aan de linker kant staan de gegevens welke benodigd zijn voor het opstellen van een logaritmische ijklijn; links boven de verschillende standaarden (0-2000 nmol/ml) en de gevonden counts, er onder de

berekende ijklijn, en de concentraties die op grond van de berekende ijklijn aan de standaarden moeten worden toegeschreven.

- In het midden staat de ijklijn uitgeplot.
- Rechts staan de gemeten monsters, het gezonden aantal counts en de berekende concentraties.

In tabel 1 staan de cortisolgehalten van de sera van kalveren, die met β -estradiol zijn behandeld.

Aan de hand van de wijze van toedienen is een vijftal groepen te onderscheiden:

- groep I : controle dieren
- groep II : dieren behandeld met een implantaat met trage afgifte
- groep III: dieren behandeld met een implantaat met 3x zo snelle afgifte als bij groep II.
- groep IV : dieren behandeld met een implantaat met afgifte snelheid tussen II en III in
- groep V : dieren behandeld met een implantaat
- groep VI : als V maar implantatie gedurende 4 i.p.v. 10 weken

Tabel 1

GR.	RIKILT nr.	Pat.nr.	Gehalte nmol/l	Gehalte ng/ml
I	5/5/4940	17	261	94,3
	5/5/4941	18	776	282
	5/5/4953	30	256	94,7
	5/5/4926	4	310	116
	5/5/4924	2	371	135
II	5/5/4944	21	350	130
	5/5/4942	19	234-271	84,8-98,1
	5/5/4951	28	199-184	72,1-66,7
	5/5/4948	25	251	93,6
	5/5/4927	5	250	92,6
	5/5/4934	11	201	75,8
	5/5/4929	7	-	-
III	5/5/4949	26	219	80,8
	5/5/4937	14	196	71,2
	5/5/4945	22	153	57,2
	5/5/4933	10	305	113
	5/5/4939	16	282	103

GR.	RIKILT nr.	Pat.nr.	Gehalte nmol/l	Gehalte ng/ml
IV	5/5/4943	20	215	79,9
	5/5/4938	15	181-202	66,1-74,3
	5/5/4957	34	519	193
	5/5/4956	33	182	69,6
	5/5/4923	1	217	79,9
	5/5/4935	12	316	117
V	5/5/4950	27	195	72,0
	5/5/4954	31	243	91,9
	5/5/4955	32	101	38,6
	5/5/4931	8	254	94,5
	5/5/4925	3	179	66,2
	5/5/4928	6	219	81,7
	5/5/4932	9	371	138
VI	5/5/4952	29	271	102
	5/5/4947	24	193	72,3
	5/5/4936	13	300	110
	5/5/4946	23	305	114

In geval van een duplo-bepaling is per monster een tweetal gemeten gehalten vermeld.

4.4 Commentaar

Cortisol kan zonder voorbereiding m.b.v. de Delfia in serum bepaald worden. De ter beschikking gestelde kit was niet toereikend om onderzoek te doen naar recovery, absolute- en relatieve detectiegrens, intra- en inter-assay variatie.

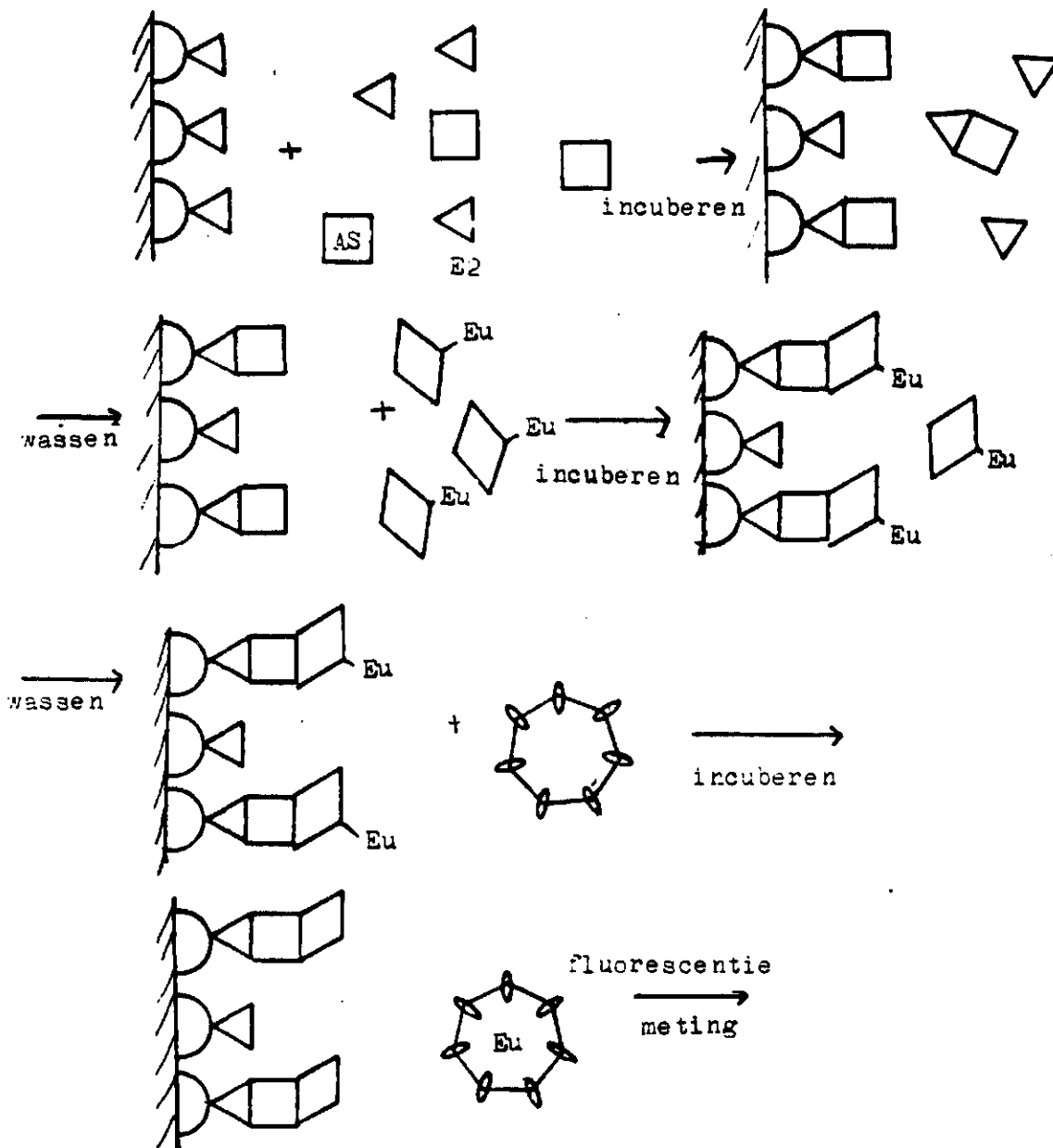
5. 17 β -estradiol

5.1 Chemicaliën

1. BSA-estradiol conjugaat
2. estradiol standaarden
3. anti-estradiol antilichaam (Bio-Mérieux, Roussel-Uclaf)
4. PBS (NaCl 8,5 g, Na₂HPO₄ 1,07 g, NaH₂PO₄, H₂O 0,3 g, NaN₃ 0,5 g/l)
pH = 7,2

5. Natrium carbonaat pH = 9,3 (0,1 M)
6. 0,1% BSA in PBS
7. 0,2% Tween 20 in PBS
8. EV-gelabeld anti-Rabbit IgG
9. TCA-assay buffer LKB
10. Enhancement solution

5.2 Schematische Weergave Estradiol-bepaling



5.3 Coating van het estradiol conjugaat (EC) aan een polystyreen well
De in de literatuur (7.1) beschreven bepaling van testosteron noemt een coating van 12,5 ng testosteron-conjugaat per well. Met deze waarde als richtlijn werd gezocht naar een optimale coatingsconcentratie voor EC.

In aanwezigheid van een overmaat antilichaam wordt het aantal gemeten counts bepaald door het aantal gecoate moleculen.

Om de optimale coatingsconcentratie voor EC te bepalen werden wells gecoat met 250 μ l 0,1 M natrium carbonaat buffer met 1000, 500, 100 en 50 ng EC.

Per concentratie werden steeds 2 strips met ieder 12 wells gecoat. Vervolgens werd 1 nacht op kamertemperatuur geïncubeerd. Vervolgens werd de vloeistof uit de wells gezogen en werden de nog onbezette plaatsen aan de polystyreen wand gevuld door toevoeging van 300 μ l 0,1% BSA in PBS.

Na 30 minuten incubatie werden de wells gewassen:

2 x PBS, 2 x Tween in PBS, 2 x PBS.

Het antiserum (Bio-Mérieux) werd opgelost in 1 ml van de door de fabrikant geleverde buffer en voor gebruik in stappen van 5 verdund.

In elke well werd 250 μ l RIA buffer gepipetteerd. Van links naar rechts per strip werd 20 μ l van de telkens 5 x verdunde antiserum oplossing gepipetteerd. Na incubatie gedurende 1 uur bij kamertemperatuur werd gewassen met 2 x PBS, 2 x Tween in PBS en 2 x PBS. Het anti-rabbit IgG europiumlabel werd opgelost in 500 μ l millipore water en het geheel werd met TCA buffer tot 25 ml aangevuld. Er werd aan elke well 250 μ l europiumlabel oplossing toegevoegd. Na incubatie gedurende 1 uur op kamertemperatuur werd gewassen met 2 x PBS, 2 x Tween in PBS, 2 x met PBS. Aan elke well werd 200 μ l "enhancement solvent", toegevoegd. Hierna werd 5 min. geschud m.b.v. de Vari-shaker. De metingen werden 10 minuten na het schudden verricht.

De resultaten zijn grafisch weergegeven in bijlage 2.

5.3.2 Commentaar

Er is weinig verschil te zien tussen het aantal counts bij een concentratie 0 (nul) van het antiserum (drooggevroren stof opgelost in 7 ml) bij coatingshoeveelheden van 1000 ng/well of 500 ng/well.

De antiserum verdunningen zijn met een te grote verdunningsfaktor toegepast. Een verdunningsfaktor van 2 zal onderzocht moeten worden. Tegelijkertijd zal gekeken worden naar coatingshoeveelheden van 400-300-200 ng/well.

5.3.3 Vervolg van coating van EC

In dit experiment werd 5.3.1 nagewerkt met EC-concentraties van 400-300-200 ng/well. Het antiserum (Bio-Mérieux) werd opgelost in 1 ml (conc. 0) RIA buffer (Bio-Mérieux) en voor gebruik in stappen van 2 verdund.

5.3.4 Commentaar

Coating met 200 ng/well gaf een signaal van 200.000 counts waarbij het antiserum in 12,5 ml RIA buffer was opgelost en er 250 µl/well was toegevoegd.

5.4 Estradiol-17β ijklijnen

Er worden 2 ijklijnen voor 17β-estradiol gemaakt:

- a. een competitieve FIA (standaarden en EC competieren met het antiserum)
- b. een verdringings FIA (EC bindt antiserum, met standaarden het antiserum van de well verdringen).

5.4.1 Werkwijze

Er werd overnacht geïncubeerd met 200 ng EC per well (200 ng EC in 250 µl 0,1 M Na₂CO₃). Hierna werd de vloeistof uit de wells gezogen en werden de wells gevuld met 300 µl 0,1% BSA in PBS (pH 7,2). Na incubatie van 30 minuten, werden de wells gewassen met 2 x PBS, 2 x Tween in PBS, 2 x PBS. Voor de competitieve ijklijn werden de wells gevuld met 125 µl standaardoplossingen, van 2 µg/ml - 0,0256 ng/ml, en 125 µl antiserum (opgelost in 6,25 ml RIA buffer). Voor de verdringingsijklijn werden de wells gevuld met 125 µl RIA buffer en 125 µl antiserum. Na incubatie gedurende 1 uur, werd gewassen met 2 x PBS, 2 x Tween in PBS, 2 x PBS. De wells voor de competitieve ijklijn werden met 250 µl europiumlabeloplossing gevuld.

De wells voor de verdringingsijklijn werden met 125 µl RIA buffer en 125 µl standaardoplossingen, van 2 µg/ml - 0,0256 ng/ml, gevuld. Voor beide ijklijnen werd 1 uur geïncubeerd. Er werd met 2 x PBS, 2 x Tween in PBS, 2 x PBS gewassen. Aan de wells van de competitieve ijklijn werd 200 µl "enhancement solvent" toegevoegd en 5 min. geschud.

De competitieve ijklijn werd 10 minuten na het schudden opgesteld. Aan de wells van de verdringingsijklijn werd 250 µl europiumlabeloplossing toegevoegd en 1 uur geïncubeerd. Er werd met 2 x PBS, 2 x Tween in PBS, 2 x PBS gewassen. In de wells werd 200 µl "enhancement solvent" gepipetteerd en gedurende 5 min. geschud. De verdringingsijklijn werd 10 minuten na het schudden opgesteld.

5.4.2 Resultaten

De competitieve ijklijn leverde een meetbaar verschil op in counts voor de verschillende standaarden. Het lineaire deel van de ijklijn lag tussen 400 - 0,64 ng/ml (7000-80.000 counts). De verdringingsijklijn vertoonde geen afname van het aantal counts bij een toename van de β-estradiol concentratie.

5.5 Er werden urines van het CLRVV en sera van de met estradiol behandelde kalveren op 17β-estradiol onderzocht. Hierbij werd geen recovery experiment uitgevoerd.

5.5.1 Methode

5.5.1.1 Voorbehandeling urines

300 µl urine werd gehydrolyseerd met 400 µl suc d'helix pomatia in hydrolyse buffer (0,2 M NaH₂PO₄ H₂O pH 4,8) gedurende 1 uur bij 37°C. Na afkoelen werd het reactiemengsel geëxtraheerd met 1 ml ether (30 sec. vortexen). De fasen werden gescheiden door 5 min. te centrifugeren bij 3000 rpm. De monsters werden in een ijsbad geplaatst. Nadat de waterige fase was bevroren werd de ether overgegoten in een ander buisje. Deze extractie werd nog éénmaal herhaald en de verzamelde etherfrakties werden drooggedampt. Het residu werd in 250 µl RIA buffer opgelost.

5.5.1.2 Delfia

Er werd, in de met EC gecoate wells, 125 µl RIA buffer of 125 µl standaardoplossing of 125 µl serum of 125 µl urine extract gepipetteerd. Daarna werd er 125 µl antiserum (opgelost in 6,25 ml RIA buffer) toegevoegd en werd vervolgens 5.4.1 toegepast.

5.5.2 Resultaten

Soort monster	RIKILT nr.	Gehalte in ng/ml	Opmerkingen
serum	5/5/4930	3,35 - 3,36	
serum	5/5/4938	2,34 - 2,09	
serum	5/5/4941	62,33 - 57,7	
serum	5/5/4942	1,39 - 1,46	
serum	5/5/4951	12,61 - 11,56	
urine	U 4463	1,89 - 2,19	rund (VR) 4 jaar
urine	U 4464	1,71 - 1,63	rund (VR) 3 jaar
urine	U 4465	3,13 - 2,16	rund (VR) 3 jaar
urine	U 4466	2,19 - 1,56	rund (VR) 4 jaar
urine	U 4467	5,26 - 5,68	rund (VR) 4 jaar
urine	U 4468	21,56 - 20,48	rund (VR) 5 jaar
urine	U 4469	1,71 - 1,49	mnl 1,5 jaar
urine	U 4471	3,96 - 3,71	rund (VR) 2,5 jaar
urine	U 4472	1,37 - 1,57	rund (VR) 2,5 jaar
urine	U 4473	9,19 - 8,08	rund (VR) 3 jaar

5.6 Specifiek 17β-estradiol antiserum

Het door Bio-Mérieux geleverde antiserum was ontoereikend en daarom moesten andere antisera worden gebruikt. De antisera zijn als volgt genummerd, 3, 4 en 5. Op grond van de aangegeven werkverduunning kreeg nr. 3 een verdunningsreeks van 1:1000-1:2000-1:4000-1:8000-1:16.000-1:32.000-1:64.000. De nummers 4 en 5 kregen een verdunningsreeks van 1:500-1:1000-1:2000-1:4000-1:8000-1:16.000. Er werd overnacht gecoat met 200 ng EC per well. De titratiecurve van a.s. nr. 3 liep van 350.000 tot 85.000 counts. De titratiecurve van a.s. nr. 4 liep van 35.000 tot 180.000 counts. De titratiecurve van a.s. nr. 5 liep van 300.000 tot 220.000 counts.

5.6.1 Commentaar

De drie antisera zijn bruikbaar in de Delfia-techniek voor estradiol. Antiserum nr. 3 zal gebruikt worden daar het met grootste verdunning 1:25.000 (125 µl/well) kan worden toegepast.

5.7 Coatingshoeveelheden en ijklijnen

De literatuur (7.2) beschrijft dat wanneer de wells voor coating geactiveerd worden met glutaaraldehyde de assay mogelijk gevoeliger en reproduceerbaarder kan worden.

5.7.1 Werkwijze

De wells werden met 250 μ l glutaaraldehyde-oplossing (250 μ l GA verdund met 24,75 ml 0,1 M Na_2O_3) gevuld en gedurende 2 uur in de stoof bij 56°C geplaatst. Hierna werd de GA-oplossing afgezogen en werd er gecoat met EC 1000 ng per well, 100 ng/well en 20 ng/well. De methode staat verder beschreven onder 5.4.1.

5.7.2 Resultaten

Het lineaire deel van de ijklijn met een coating van 1000 ng/putje en een AS-verdunning van 1:25.000 (125 μ l), verloopt van 95 ng/ml (35.000 counts) tot 3,125 μ g/ml (5000 counts). Blanco 220.000 counts. Het lineaire deel van de ijklijn, met een coating van 100 ng/putje en een AS-verdunning van 1:25.000 (125 μ l), van 87,5 pg/ml (34.000 counts) tot 11,25 ng/ml (5.500 counts). De waarde voor de blanco bedraagt 35.000 counts. Het lineaire deel van de ijklijn, met een coating van 20 ng/well en een AS-verdunning van 1:25.000 (125 μ l), verloopt van 1,36 pg/ml (50.000 counts) tot 0,7 ng/ml (20.000 counts). Blanco 40.000 counts. Het lineaire deel van de ijklijn met een coating van 1000 ng/putje was het beste reproduceerbaar.

5.8 Antiserumverduunningen bij verschillende coatingshoeveelheden

Dit was een herhaling van 5.6 met het verschil dat de antiserumverduunning was veranderd voor de verminderde coatingshoeveelheid.

5.8.1 Resultaten

De ijklijn, met een coating van 1000 ng/well en een AS-verdunning van 1:250.000 (125 μ l) verloopt met een onregelmatige daling van counts van 87,5 pg/ml (16.000 counts) tot 45 ng/ml (4000 counts). Blanco 25.000 counts. Het lineaire deel van de ijklijn, met een coating van 20 ng/well en een AS-verdunning van 1:500.000 (125 μ l) verloopt met een zeer kleine daling in counts van 2,73 pg/ml (14.000 counts) tot 1,4 ng/ml (6.000 counts). Blanco 12.000 counts.

5.9 IJKlijnen met lage coatingshoeveelheden

De coatingshoeveelheid is verlaagd om vast te stellen of hierdoor 6 stijlere ijklijnen te verkrijgen zijn (ook met GA-precoating).

5.9.1 Resultaten

Het lineaire deel van de ijklijn, met coating van 10 ng/well en een AS-verdunning van 1:100.000 (125 µl), verliep met een zeer kleine daling in counts van 1,4 ng/ml (14.000 counts) tot 45 ng/ml (5.200 counts). Blanco 22.000 counts. Het lineaire deel van de ijklijn, met een coating van 4 ng/putje en een AS-verdunning van 1:500.000 (125 µl), verliep zeer onregelmatig en vlak.

5.10 Estradiol toevoegingen aan water en urine

Door toevoeging van estradiolstandaarden (opgelost in RIA buffer) aan water, water/urine en urine kan na hydrolyse een indruk verkregen worden van de recovery.

5.10.1 Werkwijze

De activatie met GA staat beschreven in 5.7.1. De coatingshoeveelheid is 1000 ng EC per well. De monstervoorbehandeling van water, water/urine en urine werd uitgevoerd zoals beschreven in 5.5.1.1 met dien verstande, dat voor de hydrolyse de standaarden werden toegevoegd. De Delfia-procedure staat beschreven onder 5.5.1.2 en 5.4.1.

5.10.2 Resultaten

Soort monster	Toevoeging	Gevonden gehalte in ng/ml
water	0	<< 1 - << 1
water	2,44 ng/ml	9,5 - 8,6
water	4,87 ng/ml	12,2 - 13,5
water	9,75 ng/ml	25,5 - 28,0
water	19,75 ng/ml	38,0 - 36,5
water	39,5 ng/ml	80 - 95
water	78 ng/ml	150 - 140
water/urine 1/1	0	11,8 - 13,5
water/urine 1/1	2,44 ng/ml	115 - 165
water/urine 1/1	4,87 ng/ml	280 - 220
water/urine 1/1	9,75 ng/ml	18,3 - 19,8
water/urine 1/1	19,5 ng/ml	36,5 - 37,0
water/urine 1/1	39 ng/ml	38 - 46
water/urine 1/1	78 ng/ml	>1000 - > 1000

Soort monster	Toevoeging	Gevonden gehalte in ng/ml	
urine (mn rund)	0	85	- 122
urine (mn rund)	2,44 ng/ml	400	- > 1000
urine (mn rund)	4,87 ng/ml	> 1000	- > 1000
urine (mn rund)	9,75 ng/ml	> 1000	- > 1000
urine (mn rund)	19,5 ng/ml	> 1000	- > 1000
urine (mn rund)	39 ng/ml	> 1000	- > 1000
urine (mn rund)	78 ng/ml	> 1000	- > 1000
U 4822 vr. rund	0	7,5	- 8,5
U 4823 vr. rund	0	3,6	- 2,1
U 4825 mn. rund	0	90	- 100

5.10.3 Commentaar

Toevoegingen van standaarden aan water en urine hebben op het te meten estradiolgehalte een onverklaarbare invloed.

5.11 Range van ijklijn bij diverse coatingshoeveelheden

Er is onderzocht met welke coatingshoeveelheid het grootste bereik van standaarden tot stand kan worden gebracht. Dit is gedaan met coatingshoeveelheden van 10 ng EC per well - 100 ng/well en 1000 ng/well zowel met en zonder precoating met GA.

5.11.1 Resultaten

- Coating met 10 ng/well en een antiserumverduunning van 1:400.000 (125 µl) leverde een horizontale ijklijn op. De ijklijn loopt van 2,7 pg/ml (4.000 counts) tot 780 ng/ml (2.000 counts). De ijklijn die zonder GA tot stand was gekomen, was wel reproduceerbaar.
- Coating met 100 ng/putje en een antiserumverduunning van 1:100.000 (125 µl) levert eveneens nagenoeg een horizontale lijn op. De ijklijn loopt van 2,73 pg/ml (8.000 counts) tot 780 ng/ml (2.000 counts). De ijklijn die zonder GA tot stand was gekomen is beter reproduceerbaar.
- Coating met 1000 ng/putje en een antiserumverduunning van 1:25.000 (125 µl) geeft een redelijk goede ijklijn (zie bijlage 3). De ijklijn verloopt van 11 pg/ml (180.000 counts) 400 ng/ml (10.000 counts). De ijklijn die zonder GA tot stand is gekomen is reproduceerbaar.

5.11.2 Opmerkingen

Er is met een coating van 1.000 ng/ml een rechte ijklijn voor estradiol te construeren van 10 pg/ml tot 400 ng/ml, geen activatie met

GA, wel post-coating met 0,1% BSA in PBS en een AS-verdunning van 1:25.000 (125 μ l).

5.12 Estradiol toevoeging aan urine na veranderde voorbehandeling

Wells werden gecoat met 1000 ng EC per well en overnacht bij kamertemperatuur. Vervolgens werden de wells leeggezogen en gevuld met 300 μ l 0,1% BSA in PBS.

5.12.1 Monstervoorbehandeling

Naast 1 ml urine werden verschillende EV-standaarden bij de urine in een reageerbuis gepipetteerd. Vervolgens werd er 50 μ l azijnzuur/water 1:2 toegevoegd (pH \pm 5 controleren!) en de oplossing werd geschud. Vervolgens werd 1 ml enzyme-oplossing (4 ml Helix + 23 ml water + 23 ml 2M acetaatbuffer pH 5,2) aan de urine toegevoegd. Er werd gedurende 1 uur gehydrolyseerd bij 37°C. De waterige oplossing werd twee maal met 4 ml ether geëxtraheerd (snapp freeze methode). De eerste etherfractie werd drooggedampt. Het residu werd opgelost in de tweede etherfractie en hieraan werd 1 ml 10% Na₂CO₃-oplossing toegevoegd. Dit werd 30 seconden geschud en de waterfase werd verwijderd. Nogmaals werd 1 ml 10% Na₂CO₃ aan de ether toegevoegd en geschud. De waterige fase werd opnieuw verwijderd en de etherfase werd droog gedampt. Het residu werd in 1 ml RIA buffer opgelost en gedurende 30 minuten geschud.

5.12.2 Delfia

De wells werden gewassen met 2x PBS, 2x Tween in PBS, 2x PBS. In de wells werd 125 μ l RIA buffer of 125 μ l E2-standaard of 125 μ l voorbehandelde urine (5.12.1) gepipetteerd. Vervolgens werd 125 μ l antiserum (nr. 3, 1:25.000) in de wells gepipetteerd. Er werd gedurende 1 uur onder uitsluiting van licht geïncubeerd en vervolgens werden de wells gewassen met 2x PBS, 2x Tween in PBS, 2x PBS.

De wells werden gevuld met 250 μ l europiumlabel (5 μ g opgelost in 500 μ l water en aangevuld met 24,5 ml TCA buffer). Er werd 1 uur geïncubeerd. Vervolgens werden wells met 2x PBS, 2x Tween in PBS, 2x PBS gewassen. In de wells werd 200 μ l "enhancement solvent" gepipetteerd en er werd gedurende 5 minuten geschud. De ijklijn werd 10 minuten na het schudden opgesteld en van de monsters werd het gehalte vastgesteld.

5.12.3 Resultaten

Er werd een urine genomen dat van het CLRVV afkomstig was namelijk U 5131 (vr. rond 2 jaar).

Toegevoegd in ng/ml	Berekend in ng/ml
0	1,1 - 1,4 - 0,88, 1,05
0,014	0,7 - 0,56
0,056	2,7 - 1,1
0,225	3,5 - 2,15
0,900	5,1 - 3,4
3,6	13,0 - 13,0
15,6	20,0 - 20,0
62,5	65,0 - 75,0
250	105 - 88
1000	90 - 80

5.13 Zure hydrolyse van urine

Met behulp van zure hydrolyse is getracht betere resultaten, zoals hierboven staan beschreven, te verkrijgen.

Wells werden gecoat met 1000 ng EC/well en overnacht bij kamertemperatuur. Vervolgens werden de wells leeggezogen en gevuld met 300 µl 0,1% BSA in PBS.

5.13.1 Monstervoorbehandeling

Naast 1 ml urine werden verschillende E2-standaarden bij de urine in een reageerbuis gepipetteerd. Vervolgens werd er 50 µl azijnzuur/water 1:2 toegevoegd. Er werden urines niet gehydrolyseerd, gehydrolyseerd met 150 µl HCl geconc. bij kamertemperatuur en gehydrolyseerd met 150 µl HCl geconc. bij 55°C. Vervolgens werden de oplossingen ge-extraheerd met ether en de verdere procedure zoals beschreven onder 5.12.1 werd nagewerkt.

5.13.2 Resultaten

Toegevoegd aan urine	Gevonden gehalte in ng/ml			Opkl
	Geen hydrolyse	Hydrolyse KT	Hydrolyse 55°C	
0	0,40- 0,31	0,55-0,44	0,60-0,66	
0,98 ng/ml	1,34- 0,79(-0,36)	0,87-0,62(-0,50)	0,88-0,50(-0,63)	
3,9 ng/ml	3,87- 3,24(-0,36)	3,81-3,58(-0,50)	3,46-1,85(-0,63)	
15,6 ng/ml	12,21-12,14(-0,36)	15,74-17,5(-0,50)	13,87-12,07(-0,63)	
250 ng/ml	116-119(0,36)	99 - 133(0,50)	136 -116(-0,63)	

* = gecorrigeerd

5.13.3 Commentaar

Er lijkt geen hydrolyse te hebben plaatsgevonden.

5.14 Estradiol toevoegingen aan water en urine op ng/ml niveau

Er zijn opnieuw estradiolstandaarden aan water en urine (U 5131) toegevoegd zowel oude als nieuwe standaarden met suc d'helix pomatia opnieuw gehydrolyseerd ter bevestiging van eerdere resultaten (5.12.3).

5.4.1 Methode

De methode wordt beschreven in 5.12, 5.12.1 en 5.12.2.

5.14.2 Resultaten

Monsternr.	Toegevoegd	Oude standaarden		*nieuw standaard.	
		Gevonden in ng/ml	Gecorr.	Gevonden in ng/ml	Gecorr.
1 (water)	0	0,26	0,61	0,55	
2 (water)	0,49	0,87	1,10	1,09	0,54
3 (water)	0,98	1,36	1,10	1,80	1,25
4 (water)	3,91	7,03	6,77	4,26	3,71
5 (water)	15,6	26,38	26,12	17,35	16,8
6 (water)	62,5	100	99,7	63,8	63,2
7 (water)	250	211	211	209	208
8 (U5192)	0	1,04		0,51	
9 (U5192)	0,49	1,79	0,75	0,85	0,34
10 (U5192)	0,98	2,77	1,73	2,79	2,28
11 (U5192)	3,91	9,59	8,55	6,22	5,71
12 (U5192)	15,6	28,47	27,43	21,02	20,51
13 (U5192)	62,5	109	108	87	86,5
14 (U5192)	250	225	224	243	242

6. Eindconclusie

Cortisol is, met het door LKB geleverde kit en voorschrift, te bepalen in serum m.b.v. de Delfia-techniek.

Het bepalen van 17 β -estradiol, in een zelf te ontwikkelen methode, in urine ondervindt storing van matrix invloeden. De absolute detectiegrens voor 17 β -estradiol bedraagt 1 pg. De relatieve detectiegrens bedraagt 10 pg/ml (10 ppt).

7. Literatuur

7.1 E. Bertoft, J.U. Eskola, V. Nantö and T. Lövgren.
(1984),

Competative solid-phase immunoassay of testosterone using time-resolved fluorescence, FEBS, 173, 213-216.

7.2 Douglas J. Ford, Amadeo J. Pesce, 1981,

Reaction of gluturaldehyde with proteins, pages 54-66 from Enzyme immunoassay, Igaku-SHOIN, Tokio.

7.3 R. van Zoest.

April 1985,

Delfia (TR-FIA): "time resolved" fluorescentie immunotechniek in het klinisch chemisch laboratorium, lab ABC, 6, 30-33.

7.4 T. Lövgren e.a,

(1984),

Determination of hormones by time-resolved fluoroimmunoassay, Talanta, 31, 909-916.

7.5 E.A. Klasen, A. Rigutti, A. Bos and L.F. Bernini,

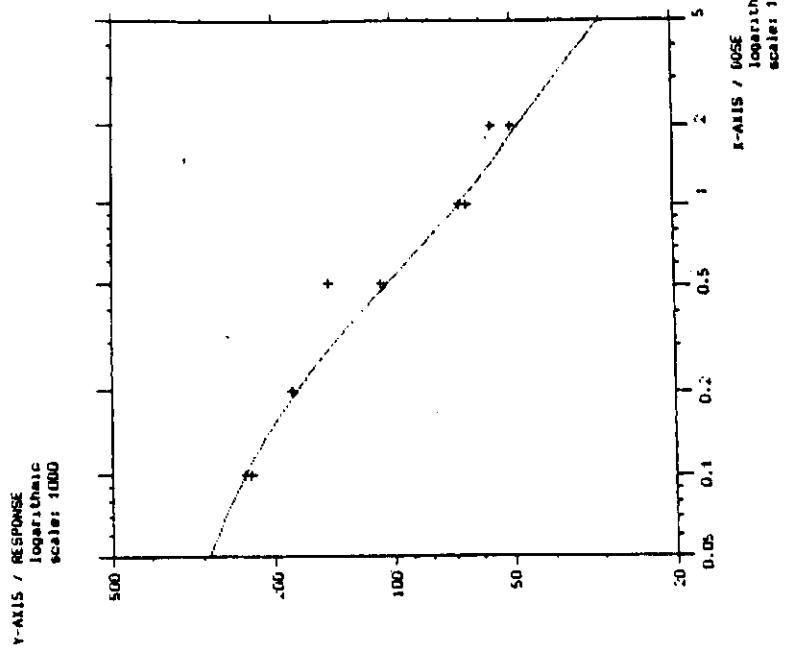
(1982), Development of a screening system for detection of somatic mutations I. Enzyme immunoassay for detection of antibodies against specific hemoglobin determinants, J. Imm. Meth., 54, 241-250.

7.6 E.A. Klasen, A. Rigutti, A. Bos and L.F. Bernini.

(1983), Development of a screening system for detection of somatic mutations II. The use of peptides and insoluble protein fragments in a non-competative solidphase enzyme immunoassay, J. Imm. Meth., 59, 281-287.

UNKNOWN SAMPLES

SEQ	PAT	COUNTS	DOSE	SCV(100)
13	1	168458	216.80	
14	2	124435	371.35	
15	3	185138	178.81	
16	4	130600	310.00	
17	5	156442	249.71	
18	6	167838	218.95	
19	7	118850	OUT	
20	8	154925	254.23	
21	9	124595	371.35	
22	10	139924	305.04	
23	11	174936	201.12	
24	12	137185	315.59	
25	13	141546	300.13	
26	14	177304	196.10	
27	15	174778	201.53	
28	16	146381	281.62	
29	17	153720	257.85	
30	18	79243	775.83	
31	19	150715	267.62	
32	20	169322	214.66	
33	21	128991	350.45	
34	22	198501	153.33	
35	23	139825	305.31	
36	24	178383	193.30	
37	25	155972	251.13	
38	26	167721	218.74	
39	27	177768	194.70	
40	28	185212	178.81	
41	29	149582	270.92	
42	30	154423	255.68	
43	31	158576	243.37	
44	32	234064	101.35	
45	33	183734	181.92	
46	34	101450	519.12	
47	35	122654	361.26	
48	36	140361	303.40	



PARAMETER GROUP 1 32

ASSAY TYPE : FIA
 FITTING METHOD : SPLINE SMOOTHED
 X-AXIS : LOGARITHMIC
 Y-AXIS : LOGARITHMIC
 BLANKS : 0
 STANDARD REPLICATES : 4
 STANDARD 1 CONC : 0.00
 STANDARD 2 CONC : 100.00
 STANDARD 3 CONC : 200.00
 STANDARD 4 CONC : 500.00
 STANDARD 5 CONC : 1000.00
 STANDARD 6 CONC : 2000.00
 UNKNOWN REPLICATES : 1

DATA STORED TO DATAFILE : 04

SEQ	CONC	COUNTS	DOSE	SCV
1	STD 1	383703	0.00	
2	STD 1	386250	0.00	
MEAN		384977	0.00	0.47
3	STD 2	235016	100.00	
4	STD 2	227837	100.00	
MEAN		231427	100.00	2.19
5	STD 3	180905	200.00	
6	STD 3	178629	200.00	
MEAN		179767	200.00	0.90
7	STD 4	144501	500.00	
8	STD 4	107009	500.00	
MEAN		125755	500.00	21.08
9	STD 5	68279	1000.00	
10	STD 5	65544	1000.00	
MEAN		66922	1000.00	2.87
11	STD 6	54663	2000.00	
12	STD 6	50639	2000.00	
MEAN		53751	2000.00	8.19

BLANK = not coded (0)
 0-STD= 384972

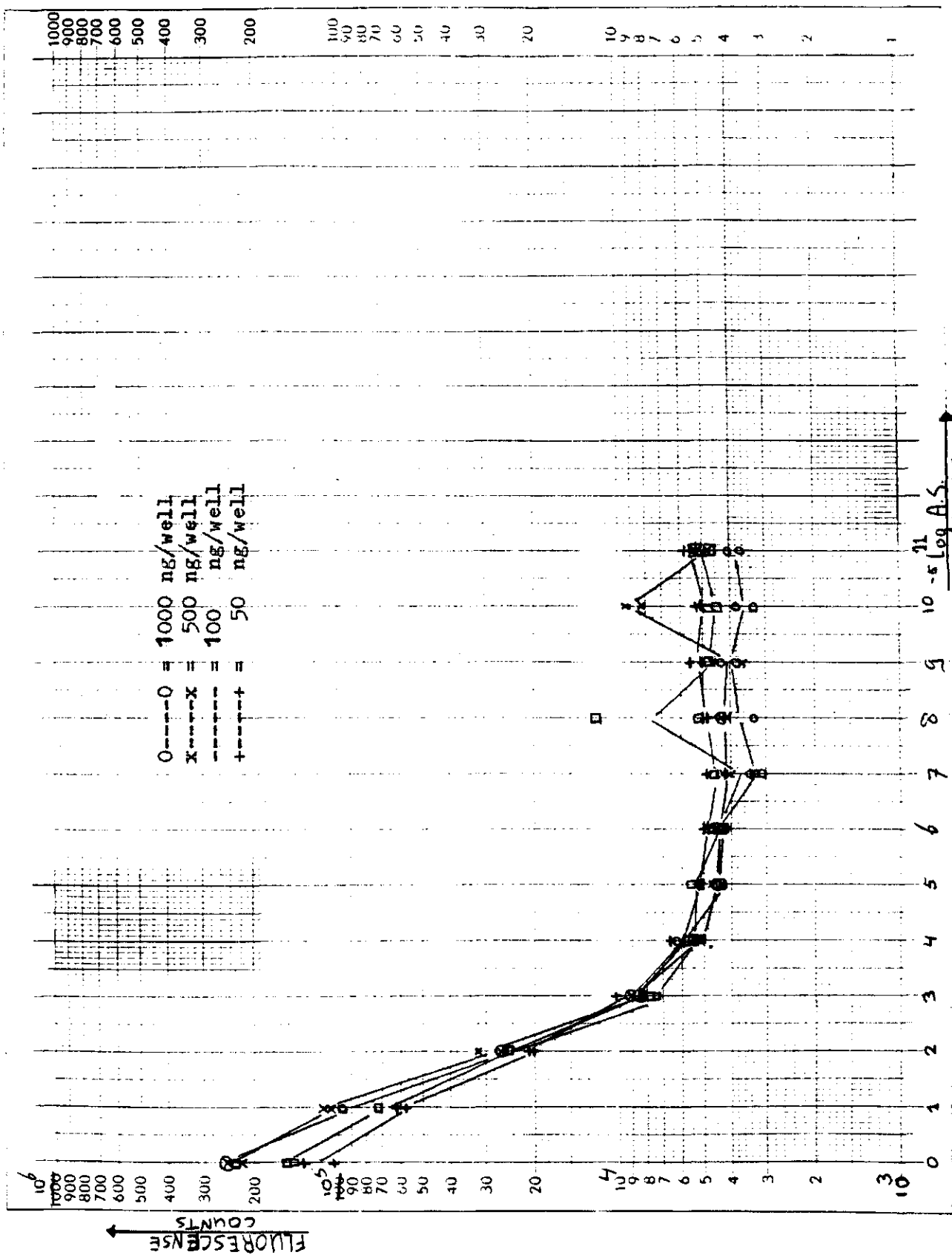
STANDARD	DOSE	CALC.DOSE	RESPONSE	SCV/RESP.	SCV(DOSE)
0	0.00	0.44	383699		
0	0.00	0.00	386246		
MEAN		0.03	384972	0.47	
1	100.00	100.24	235013		
1	100.00	109.15	227835		
MEAN		104.86	231424	2.19	6.02
2	200.00	187.76	180903		
2	200.00	192.84	178626		
MEAN		190.30	179765	0.90	1.88
3	500.00	288.13	144500		
3	500.00	476.31	107008		
MEAN		366.45	125754	21.08	34.81
4	1000.00	1003.47	68278		
4	1000.00	1081.35	65545		
MEAN		1040.31	66922	2.87	5.28
5	2000.00	1428.52	54663		
5	2000.00	1821.09	50639		

INTERPOLATION (METHOD) = SPLINE SMOOTHED
 X-AXIS (DOSE) = LOGARITHMIC INTERCEPT = 382264.000
 Y-AXIS (RESPONSE) = LOGARITHMIC VARIANCE RATIO = 3.0994

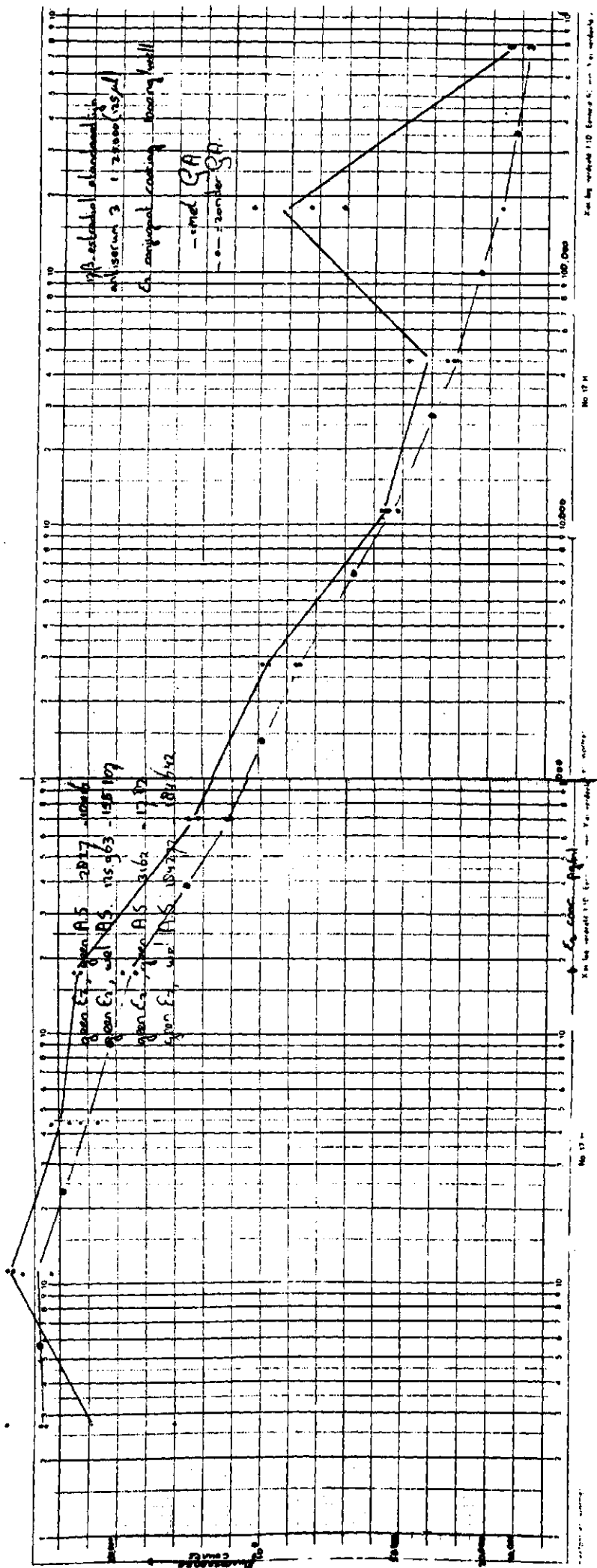
STANDARD	DOSE	CALC.DOSE	RESPONSE	SCV/RESP.	SCV(DOSE)
0	0.00	0.44	383699		
0	0.00	0.00	386246		
MEAN		0.03	384972	0.47	
1	100.00	100.24	235013		
1	100.00	109.15	227835		
MEAN		104.86	231424	2.19	6.02
2	200.00	187.76	180903		
2	200.00	192.84	178626		
MEAN		190.30	179765	0.90	1.88
3	500.00	288.13	144500		
3	500.00	476.31	107008		
MEAN		366.45	125754	21.08	34.81
4	1000.00	1003.47	68278		
4	1000.00	1081.35	65545		
MEAN		1040.31	66922	2.87	5.28
5	2000.00	1428.52	54663		
5	2000.00	1821.09	50639		

*** END OF ASSAY ***

BIJLAGE 2



meetopdracht worden
 11 10002
 X-as verdeeld in mm. Y-as log A.S. VERDUNNING



INTERPOLATION (METHOD) = SPLINE SMOOTHED
 X-AXIS (DOSE) = LOGARITHMIC
 Y-AXIS (RESPONSE) = LINEAR

INTERCEPT = 76695.700
 VARIANCE RATIO = 0.134

STANDARD	DOSE	CALC. DOSE	RESPONSE	SCV/RESP	SCV/DOSE	SEQ	PAT	COUNTS	DOSE	SCV/DOSE
0	0.00	0.00	130146			19	1	1125	898.19	
0	0.00	0.00	130435			20	1	1072	904.89	
MEAN		0.00	130240	0.16		MEAN		1099	901.54	0.53
1	0.38	0.39	96130		5.55	21	2	86310	0.62	
1	0.38	0.42	94493			22	2	91098	0.49	
MEAN		0.40	95312	1.21		MEAN		88704	0.55	16.08
2	0.76	0.71	83475			23	3	71446	1.34	
2	0.76	0.82	80525			24	3	78767	0.90	
MEAN		0.76	82000	2.54	10.33	MEAN		75098	1.09	27.71
3	3.05	3.10	58649			25	4	71209	1.36	
3	3.05	2.99	59128			26	4	61999	2.44	
MEAN		3.04	58889	0.58	2.43	MEAN		66604	1.80	40.50
4	12.21	15.01	37785			27	5	53503	4.49	
4	12.21	9.94	42930			28	5	54985	4.03	
MEAN		12.22	40358	9.02	28.49	MEAN		54244	4.26	7.82
5	24.42	17.11	36177			29	6	36175	17.11	
5	24.42	30.17	29561			30	6	35838	17.59	
MEAN		22.65	32769	14.71	39.07	MEAN		36007	17.35	1.96
6	97.66	95.46	17142			31	7	21556	60.64	
6	97.66	100.04	16732			32	7	20508	67.15	
MEAN		97.69	16937	1.71	3.30	MEAN		21032	63.79	7.20
7	390.65	384.46	7086			33	8	10933	213.75	
7	390.65	351.76	7045			34	8	11260	203.72	
MEAN		390.52	7066	0.41	0.42	MEAN		11097	208.75	3.40

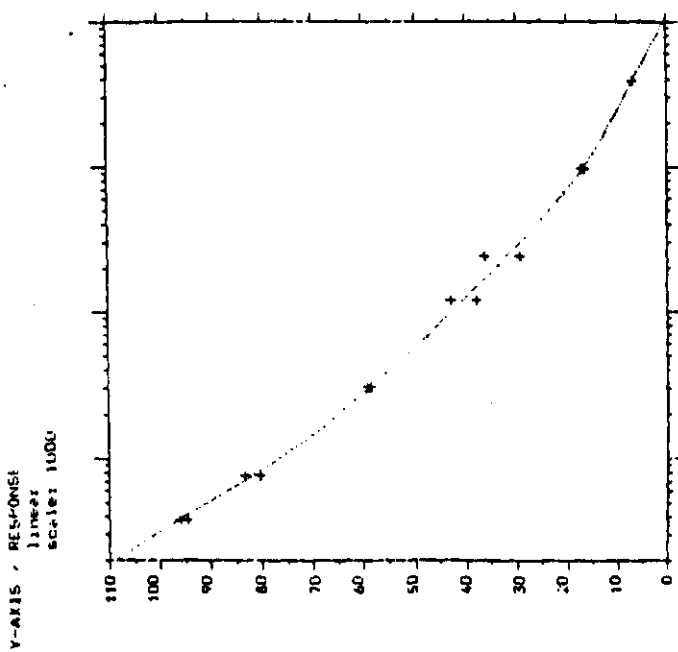
*** 1R-FIA MEASUREMENT DU-DEC-1985 12:15: ***

PARAMETER GROUP : 33

ASSAY TYPE : FIA
 FITTING METHOD : SPLINE SMOOTHED
 X-AXIS : LOGARITHMIC
 Y-AXIS : LINEAR
 PLANKS : 1 2
 STANDARD REPLICATES : 1 2
 STANDARD 1 CONC : 0.00
 STANDARD 2 CONC : 0.38
 STANDARD 3 CONC : 0.76
 STANDARD 4 CONC : 3.05
 STANDARD 5 CONC : 12.21
 STANDARD 6 CONC : 24.42
 STANDARD 7 CONC : 97.66
 STANDARD 8 CONC : 390.65
 UNKNOWN REPLICATES : 1 2

DATA NOT STORED

SEQ	CODE	COUNTS	DOSE	SCV
1	BLAN	1413	0.00	
2	BLAN	1265	0.00	7.6
MEAN		1339		
3	STU 1	130146	0.00	
4	STU 1	130435	0.00	0.16
MEAN		130290		
5	STU 2	96130	0.38	
6	STU 2	94493	0.38	1.21
MEAN		95312		
7	STU 3	83475	0.76	
8	STU 3	80525	0.76	2.54
MEAN		82000		
9	STU 4	58649	3.05	
10	STU 4	59128	3.05	0.58
MEAN		58889		
11	STU 5	37785	12.21	
12	STU 5	42930	12.21	9.02
MEAN		40358		
13	STU 6	36177	24.42	
14	STU 6	29561	24.42	14.71
MEAN		32769		
15	STU 7	17142	97.66	
16	STU 7	16732	97.66	1.71
MEAN		16937		
17	STU 8	7086	390.65	
18	STU 8	7045	390.65	0.41
MEAN		7066		
BLAN		1339		
0-STU		130290		



*** END OF ASSAY ***