Afdeling Additieven 1982-09-23

Verslag 82.78 Pr.nr. 505.0620

Onderwerp: Bepalen van de titer, werkverdunning en de specificiteit van het Diëthylstilbestrol antiserum RIV 0646/0647.

Verzendlijst: direkteur, direktie VKA, sektorhoofd (3x), afdeling Additieven (6x), afdeling Normalisatie (Humme), Projektbeheer.

8278

Afdeling Additieven Datum: 1982-09-23

VERSLAG 82.78 Pr.nr. 505.0620

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

Onderwerp: Bepalen van de titer, werkverdunning en de specificiteit van het Diëthylstilbestrol antiserum RIV 0646/0647.

Doel:

Enige karaktereigenschappen van het Diëthylstilbestrol antiserum RIV 0646/0647 vast te stellen.

Samenvatting:

Om de aanwezigheid van antilichamen te kwantificeren kan een antiserum-titratiecurve gemaakt worden. Uit deze curve kan men de titer (= die antiserumverdunning waarbij 50% van de toegevoegde hoeveelheid tracer gebonden wordt) en de werkverdunning (= die antiserumverdunning waarbij 40 tot 50% van de toegevoegde hoeveelheid tracer gebonden wordt, onder de omstandigheden van de later uit te voeren bepaling) aflezen.

Voor de bepaling van de specificiteit van een antilichaam gaat men na in hoeverre het antiserum reageert met andere verbindingen dan het eigen antigeen.

Conclusie:

De titer van het antiserum RIV 0646/0647 is 1:5700.

De werkverdunning van het antiserum RIV 0646/0647 ligt tussen 1:10000 en 1:5700.

Het DES antiserum RIV 0646/0647 reageert voor 3,9% met Diënestrol en voor 13,5% met Hexestrol.

Estradiol, Estriol, Oestron, Trenbolon en Zeranol geven geen kruisreactie met het genoemde antiserum.

Verantwoordelijk: dr W.G. de Ruig

Projektleider: dr W.G. de Ruig

Medewerkers/Samenstellers: M.C.J. Berghmans, Th.H.G. Polman

1. Inleiding

Wanneer soortvreemde stoffen (lichaamsvreemde stoffen) een organisme binnendringen, reageert het lichaam hierop met een afweerreactie. Deze afweerreactie, ook wel immunogene reactie genoemd, bestaat uit het produceren van antistoffen (veelal antilichamen genoemd) die een binding aangaan met de lichaamsvreemde stof zodat deze geremd zo niet "gedood" wordt. De reactie van een antilichaam met een antigeen (de lichaamsvreemde stof) is zeer specifiek, d.w.z. ieder antigeen heeft zijn eigen antilichaam en zal alleen hiermee een binding aangaan.
Om antistoffen te verkrijgen tegen DES, Diëthylstilbestrol, worden b.v. konijnen geimmuniseerd. In het verkregen bloedserum zullen zich antistoffen tegen het DES bevinden met een bepaalde concentratie en specificiteit. Om de aanwezigheid van antilichamen te kwantificeren kan een antiserum-titratiecurve gemaakt worden. Uit deze curve kunnen we de titer van het antiserum aflezen (= die antiserumverdunning waarbij 50% van de toegevoegde tracer gebonden wordt) en welke werkverdunning we moeten gebruiken in de radio-immuno-assay. De juiste werkverdunning is zeer belangrijk aangezien deze mede de gevoeligheid van de RIA bepaalt. Immers bij te weinig antiserum zijn er te weinig bindingsplaatsen aanwezig voor een reeële competitie. Bij te veel daarentegen moet er eerst veel DES gebonden worden eer het zijn radio-actieve tegenhanger kan verdringen.
Indien we weten welke antiserumwerkverdunning we moeten gebruiken bij de RIA's, kunnen we de specificiteit van ons antiserum testen door andere stoffen dan DES eveneens met het DES antiserum te laten reageren.

2. Bepaling van de titer en werkverdunning van het DES antiserum (RIV 0646/0647) door middel van het maken van een antiserum-titratiecurve.

2.1 Principe

Er wordt een verdunningsreeks gemaakt van het antiserum. Voor elke verdunning wordt B/T berekend en in een grafiek uitgezet tegen de verdunning.

2.2 Definitie

Onder de titer van een antiserum wordt verstaan de verdunning waarbij 50% van de toegevoegde hoeveelheid tracer gebonden wordt. De werkverdunning is die verdunning waarbij 40 tot 50% van de toegevoegde hoeveelheid tracer gebonden wordt, onder de omstandigheden van de later uit te voeren bepaling.

2.3 Werkwijze

Het DES antiserum RIV code 0646/0647 is de droogrest van 0,5 ml gevriesdroogd antiserum. Neem deze op in 0,5 ml H_2O en bewaar het bij -20°C.

Verdun 0,05 ml antiserum met 0,02 M fosfaatbuffer van b.v. 1:8 tot 1:32768.
Voeg aan 0,05 ml van elke verdunning 0,4 ml fosfaatbuffer toe; inclusief aan 2 buisjes zonder antiserum (= ASB).
Voeg aan elk buisje 0,05 ml ^{3}H-DES toe, in die hoeveelheid die men later bij de RIA-bepaling gebruikt. Hiervoor is een hoeveelheid gekozen die bij tellen $\pm$ 20000 dpm geeft. Dit is in de praktijk een geschikte hoeveelheid gebleken om bij de RIA een redelijke telsnelheid (minimaal 300 dpm) te geven. Pipetteer in 5 telpotjes eveneens 0,05 ml ^{3}H-DES (Totaal-telling). Vortex alle buisjes.
Incubeer 30 min. in een waterbad van 37°C. Incubeer 30 min. bij 4°C.
Pipetteer bij 4°C in alle buisjes 0,2 ml actieve kooloplossing en vortex.
Incubeer 5 min. bij 4°C.
Centrifugeer 10 min. bij 3000 rpm in een gekoelde centrifuge (4°C).
Breng van elk supernatant 0,45 ml over in een plastic telflesje.
Pipetteer in alle telflesjes 10 ml scintillatievloeistof en meet de radio-activiteit in een vloeistofscintillatieteller.
Voer alle bepalingen uit in duplo.

2.4 Resultaten: 1982-03-30.

2.4.1 Tabel: Bepaling van de titer en werkverdunning van het antiserum 0646/0647.

Antiserum verdunning	Telling gebonden fractie (B)		Gecorr. tell. gebonden fractie (Bgec)		B/T	
	dpm	dpm	dpm	dpm	%	%
1: 8	11036	10995	14654	14590	74	74
1: 16	11447	11431	15293	15268	78	78
1: 32	10620	10969	14006	14549	71	74
1: 64	11758	10786	15776	14264	80	72
1: 128	10501	10562	13821	13916	70	71
1: 256	10396	10465	13658	13765	69	70
1: 512	10195	10236	13345	13409	68	68
1: 1024	9923	9744	12922	12643	66	64
1: 2048	8922	9755	11364	12661	58	64
1: 4096	8585	8175	10841	10203	55	52
1: 8192	7071	7302	8486	8845	43	45
1:16384	5721	5473	6386	6000	32	30
1:32768	3335	3656	2674	3173	14	16
ASB	926	1152	-	-	-	-

2.5 Berekening

Totaal toegevoegde hoeveelheid ^{3}H-DES :19700 dpm = T

$$B \text{ (gecorrigeerd)} = \left(B \times \frac{700}{450}\right) - \left(ASB \times \frac{700}{450}\right)$$

$$\% \; B/T = \frac{\left(B \times \frac{700}{450}\right) - \left(ASB \times \frac{700}{450}\right) \times 100}{T}$$

hierin is:

B = telling gebonden fractie (dpm)

700 = volume voor afname gebonden fractie (µl)

450 = afname gebonden fractie (µl)

ASB = telling gebonden fractie van de aspecifieke binding (dpm)

T = totaaltelling.

2.6 Conclusie

Uit figuur 1 blijkt dat de titer van het antiserum RIV 0646/0647 1:5700 is.

De werkverdunning van het antiserum ligt tussen de 1:5700 en 1:10000.

Figuur 1: Antiserum-titratiecurve d.d. 1982-03-30.

3. De invloed van verschillende antiserumconcentraties op de DES ijkcurve

3.1 Principe

Een aantal DES-standaardreeksen wordt met verschillende antiserumwerkverdunningen geincubeerd.
Van elke standaard wordt het percentage binding berekend en in een grafiek uitgezet tegen de teruggevonden concentratie van DES.

3.2 Werkwijze

Maak 8 standaardreeksen DES in de concentratie van 20-50-100-250-500 en 1000 pg DES/0,1 ml ethanol. Maak verschillende antiserumwerkverdunningen door 0,05 ml antiserum (1:180) te verdunnen met RIA-buffer, zodanig dat werkverdunningen ontstaan van 1:6000, 1:9000, 1:12000, 1:18000.
Voer de RIA uit met twee standaardreeksen voor elke werkverdunning.
Neem bij elke standaardreeks een aantal Bo en ASB's mee.
Bereken voor elk standaardpunt, Bo en ASB het percentage binding.

3.3 Resultaten

3.3.1 Tabel: DES standaardlijn met antiserumwerkverdunning van 1:6000.

Toegevoegde hoeveelheid DES	Opbrengst telling	Opbrengst	Opbrengst toegevoegde hoeveelheid DES	Telling gebonden fractie	Gebonden fractie
pg/100 µl	dpm	%	pg/100 µl	dpm	%
Bo	3323-3067	72 - 67		6848-6400	69 - 70
Bo	3114-3141	68 - 68		6510-6146	70 - 65
Bo	3128-3130	68 - 68		7139-6518	76 - 69
Bo	3289-3134	71 - 68		7072-6878	72 - 73
20	3101-3297	67 - 72	13 - 14	4821-4670	52 - 47
50	3112-3218	67 - 70	34 - 35	3480-3487	37 - 36
100	3161-3209	69 - 70	69 - 70	2929-2699	31 - 28
250	3228-3230	70 - 70	175 - 175	2065-1931	21 - 20
500	2979-3088	65 - 67	325 - 335	1477-1394	17 - 15
1000	3025-2995	66 - 65	660 - 650	1228-1072	14 - 12
ASB	3115-3026	68 - 66		1199- 650	13 - 7
ASB	3346-3209	73 - 70		604- 677	6 - 7
ASB	3060-3015	66 - 65		511- 615	6 - 7
ASB	3116-3073	68 - 67		595- 786	6 - 9
(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)

$$\text{Opbrengst toegevoegde hoeveelheid DES} = \text{Toegevoegde hoeveelheid DES} \times \frac{\%\ \text{Opbrengst}}{100}$$

$$(4) = (1) \times \frac{(3)}{100}$$

$$\%\ \text{Opbrengst} = \frac{\text{dpm Opbrengsttelling}}{\text{dpm Totaaltelling}}$$

3.3.2 Tabel: DES standaardlijn met antiserumwerkverdunning van 1:9000

Toegevoegde hoeveelheid DES	Opbrengst telling	Opbrengst	Opbrengst toegevoegde hoeveelheid DES	Telling gebonden fractie	Gebonden fractie
pg/100 µl	dpm	%	pg/100 µl	dpm	%
Bo	3253-3125	71 - 68		4912-5405	50 - 58
Bo	3169-2890	69 - 63		5515-5182	58 - 60
Bo	3355-3138	73 - 68		5175-5136	51 - 55
Bo	3202-3336	72 - 72		5215-5026	53 - 50
20	3248-2796	70 - 61	14 - 12	3508-3603	36 - 43
50	3150-3264	68 - 71	34 - 35	2808-2628	30 - 27
100	3087-3199	67 - 69	67 - 69	2312-2324	25 - 24
250	3145-3071	68 - 67	170 - 168	1548-1802	16 - 20
500	3136-3047	68 - 66	340 - 330	1378-1074	15 - 12
1000	3109-3362	67 - 73	670 - 730	1177-1256	13 - 12
ASB	3430-3195	74 - 69		861- 786	8 - 8
ASB	3218-3081	70 - 67		739- 640	8 - 7
ASB	3375-3111	73 - 67		747- 827	7 - 9
ASB	3743-3077	81 - 67		1036- 689	9 - 7

3.3.3 Tabel: DES standaardlijn met antiserumwerkverdunning van 1:12000

Toegevoegde hoeveelheid DES	Opbrengst telling	Opbrengst	Opbrengst toegevoegde hoeveelheid DES	Telling gebonden fractie	Gebonden fractie
pg/100 µl	dpm	%	pg/100 µl	dpm	%
Bo	3297-3150	72 - 68		4585-4874	46 - 52
Bo	3057-3181	66 - 69		4600-4535	50 - 48
Bo	3232-3158	70 - 68		4355-4714	45 - 50
Bo	3358-3156	73 - 68		4699-4849	47 - 51
20	3192-3077	69 - 67	14 - 13	3435-3286	36 - 36
50	3131-3127	68 - 68	34 - 34	2383-2638	25 - 28
100	3177-2978	69 - 65	69 - 65	2325-1915	24 - 21
250	3339-3169	72 - 69	180 - 172	1514-1679	15 - 18
500	3199-3014	69 - 65	345 - 325	1602-1515	17 - 17
1000	3250-3292	70 - 71	700 - 710	1355-1423	14 - 14
ASB	3269-3120	71 - 68		1125- 994	11 - 11
ASB	3460-3342	75 - 72		1096-1479	11 - 15
ASB	3523-3466	76 - 75		1238-1042	12 - 10
ASB	3276-3266	71 - 71		953- 972	10 - 10

3.3.4 Tabel: DES standaardlijn met antiserumverdunning van 1:18000

Toegevoegde hoeveelheid DES	Opbrengst telling	Opbrengst	Opbrengst toegevoegde hoeveelheid DES	Telling gebonden fractie	Gebonden fractie
pg/100 µl	dpm	%	pg/100 µl	dpm	%
Bo	3243-3273	70 - 71		3679-3718	38 - 38
Bo	3220-3010	70 - 65		3765-3687	39 - 41
Bo	3381-3200	73 - 69		3843-3878	38 - 40
Bo	3156-3068	68 - 67		3589-3809	38 - 41
20	3072-3045	67 - 66	13 - 13	2569-2832	28 - 31
50	3370-3199	73 - 69	36 - 34	2456-2094	24 - 22
100	3057-3203	66 - 69	66 - 69	1956-2289	21 - 24
250	3113-2976	68 - 65	170 - 162	1522-1463	16 - 16
500	3355-3089	73 - 67	365 - 335	1412-1331	14 - 14
1000	3141-3308	68 - 72	680 - 720	1365- 873	14 - 9
ASB	3098-3157	67 - 68		1373-1389	15 - 15
ASB	3105-2998	67 - 65		1166-1046	13 - 12
ASB	3107-3213	67 - 70		1030- 942	11 - 10
ASB	3279-3099	71 - 67		965- 989	10 - 11

3.4 Conclusie

Uit figuur 2 blijkt dat:

Naarmate de antiserumverdunning toeneemt, zal de gevoeligheid van de RIA vooral in het lage gebied afnemen; immers een kleine verhoging van DES geeft ook een kleine daling van het percentage binding, terwijl bij b.v. 1:6000 een kleine verhoging een grote daling teweeg brengt m.a.w. de gevoeligheid stijgt naarmate de antiserumconcentratie groter wordt.

N.B. Gebruik van een overmaat aan antilichaam zal de gevoeligheid van de RIA doen dalen, omdat dan een grote hoeveelheid van het DES eerst bindingsplaatsen moet bezetten eer de tracer door competitie in voldoende mate wordt verdrongen.

Figuur 2: DES standaardlijnen met verschillende antiserumwerkverdunningen.

4. Het bepalen van het percentage kruisreactie van andere stoffen dan DES met het DES antiserum.

4.1 Principe

Een reeks verbindingen, die mogelijk met het DES antiserum zouden kunnen reageren, worden geïncubeerd met DES antiserum. Van deze stoffen worden de % B/Bo berekend en vergeleken met % B/Bo van een DES standaardcurve.

4.2 Definitie

Onder kruisreactie wordt verstaan in hoeverre het antiserum reageert met andere verbindingen dan het eigen antigeen.

4.3 Werkwijze

Maak duplo standaardreeksen van DES, Diënestrol, Hexestrol, Estradiol, Estriol, Oestron, Trenbolon en Zeranol in concentraties van 20-50-100-250-500-1000 pg/0,1 ml ethanol p.a.. Neem bij iedere standaardreeks een nulpunt 'Bo' en een blanco 'ASB' mee.

Pipetteer van deze standaardoplossingen 0,1 ml in een glazen buisje en voeg toe 0,05 ml ^{3}H-DES (in ethanol p.a., $\pm$ 20000 dpm). Voor de Bo en ASB worden in eenzelfde buisjes eveneens 0,05 ml ^{3}H-DES gepipetteerd en i.p.v. 0,1 ml standaardoplossing, 0,1 ml ethanol p.a. Pipetteer eveneens 0,05 ml ^{3}H-DES in 5 plastic telflesjes voor de totaaltellingen. Damp de buisjes droog en voeg toe aan de Bo en standaardpunten 0,45 ml RIA-buffer en aan de ASB 0,5 ml RIA-buffer.

Vortex alle buisjes 15 min. Voeg toe aan de Bo en standaardpunten 0,05 ml antiserum (1:7200). Vortex alle buisjes. Incubeer 30 min. bij 37°C en 30 min. bij 4°C. Breng 0,1 ml van elk incubatiemengsel over in een plastic telflesje (Opbrengsttelling).

Pipetteer bij 4°C in alle buisjes 0,2 ml actieve koolsuspensie en vortex. Incubeer 5 min. bij 4°C. Centrifugeer 10 min. bij 3000 rpm in een gekoelde centrifuge (4°C). Pipetteer van elk supernatant 0,45 ml in een plastic telflesje (Boundtelling).

Pipetteer in alle telflesjes 10 ml scintillatievloeistof en meet de radioactiviteit in een vloeistofscintillatieteller.

4.4 Resultaten

4.4.1 Tabel: Standaardlijn DES met DES antiserum (1:7200)

Toegevoegde hoeveelheid DES	Dpm R gecorr.	Opbrengst	Terugge-vonden concentr.	Dpm B gecorr.	Binding	B/BO
pg/100 µl		%	pg/100 µl		%	%
Bo	15370	70		9528	62	
Bo	16870	77		10073	60	>61
20	15065	69	14	6508	43	65
50	15735	72	36	5085	32	44
100	16070	74	74	4160	26	33
250	16985	78	195	3320	20	21
500	17525	80	400	2760	16	13
1000	15885	73	730	2143	14	10
ASB	16745	77		1413	8	
ASB	17200	79		1627	10	>9

4.4.2 Tabel: Standaardlijn Diënestrol (DE) met DES antiserum (1:7200)

Toegevoegde hoeveelheid DE	Dpm R gecorr.	Opbrengst	Terugge-vonden concentr.	Dpm B gecorr.	Binding	B/BO
pg/100 µl		%	pg/100 µl		%	%
Bo	16910	78		9965	59	
Bo	17395	80		10530	60	>60
20	17595	81	16	9707	55	90
50	16970	78	39	9098	54	88
100	16895	78	78	7933	47	74
250	16895	78	195	7347	44	69
500	16350	75	375	6338	39	59
1000	16435	75	750	5693	35	51
ASB	16735	77		1833	11	
ASB	17710	81		1158	7	>9

4.4.3 Tabel: Standaardlijn Hexestrol (HEX) met DES antiserum (1:7200)

Toegevoegde hoeveelheid HEX	Dpm R gecorr.	Opbrengst	Terugge-vonden concentr.	Dpm B gecorr.	Binding		B/BO
pg/100 µl		%	pg/100 µl		%		%
Bo	16400	75		9353	57	>60	
Bo	16550	76		10480	63		
20	16480	76	15	8525	52		84
50	16770	77	39	7557	45		70
100	16490	76	76	6845	42		65
250	17140	79	198	6168	36		53
500	16720	77	385	5085	30		41
1000	16465	76	760	5003	30		41
ASB	17080	78		1448	8	>9	
ASB	17640	81		1567	9		

4.4.4 Tabel: Standaardlijn Estradiol (E_2) met DES antiserum (1:7200)

Toegevoegde hoeveelheid E_2	Dpm R gecorr.	Opbrengst	Terugge-vonden concentr.	Dpm B gecorr.	Binding		B/BO
pg/100 µl		%	pg/100 µl		%		%
Bo	17490	80		10635	61	>62	
Bo	16690	77		10345	62		
20	16990	78	14	10198	60		96
50	16715	77	38	10762	64		104
100	16985	78	78	10735	63		102
250	16320	75	188	9418	58		92
500	16625	76	380	11207	67		109
1000	15245	70	700	9687	64		104
ASB	17075	78		1772	10	>9	
ASB	17685	81		1455	8		

4.4.5 Tabel: Standaardlijn Estriol (E_3) met DES antiserum (1:7200)

Toegevoegde hoeveelheid E_3	Dpm R gecorr.	Opbrengst	Terugge-vonden concentr.	Dpm B gecorr.	Binding		B/BO
pg/100 µl		%	pg/100 µl		%		%
Bo	16855	77		10920	65	>64	
Bo	16020	74		9860	62		
20	16015	74	14	10078	63		98
50	16100	74	37	10003	62		96
100	16115	74	74	11075	69		109
250	15740	72	180	9645	61		95
500	16625	76	330	10145	61		95
1000	15815	72	720	10033	63		98
ASB	16570	76		1537	9	>9	
ASB	17700	81		1548	9		

4.4.6 Tabel: Standaardlijn Oestron (O) met DES antiserum (1:7200)

Toegevoegde hoeveelheid O	Dpm R gecorr.	Opbrengst	Terugge-vonden concentr.	Dpm B gecorr.	Binding		B/BO
pg/100 µl		%	pg/100 µl		%		%
Bo	15555	71		10437	67	>66	
Bo	16085	74		10353	64		
20	15670	72	14	9693	62		93
50	17030	78	39	10347	61		91
100	17190	79	79	10323	60		89
250	16535	76	190	9807	59		88
500	15550	71	355	9965	64		96
1000	16725	77	770	10247	61		91
ASB	16605	76		1623	10	>9	
ASB	17510	80		1487	8		

4.4.7 Tabel: Standaardlijn Trenbolon (TBOH) met DES antiserum (1:7200)

Toegevoegde hoeveelheid TBOH	Dpm R gecorr.	Opbrengst	Terugge-vonden concentr.	Dpm B gecorr.	Binding		B/BO
pg/100 µl		%	pg/100 µl		%		%
Bo	16140	74		11020	68	>66	
Bo	16630	76		10793	65		
20	15975	73	15	10167	64		96
50	16375	75	37	10082	62		93
100	16480	76	76	11873	72		111
250	16075	74	185	10235	64		96
500	16890	78	390	11025	65		98
1000	15555	71	710	10350	66		100
ASB	17545	80		1940	11	>12	
ASB	16960	78		2038	12		

4.4.8 Tabel: Standaardlijn Zeranol (Z) met DES antiserum (1:7200)

Toegevoegde hoeveelheid Z	Dpm R gecorr.	Opbrengst	Terugge-vonden concentr.	Dpm B gecorr.	Binding		B/BO
pg/100 µl		%	pg/100 µl		%		%
Bo	16245	74		9952	61	>62	
Bo	16320	75		10267	63		
20	16090	74	15	10373	64		104
50	15775	72	36	10450	66		108
100	16120	74	74	10743	67		110
250	15835	73	183	10195	64		104
500	16500	76	380	11403	69		115
1000	15450	71	710	10498	68		112
ASB	16520	76		2290	14	>14	
ASB	17005	78		2370	14		

Dpm R gecorr. = gemeten terugwinning R, gecorrigeerd voor deelmonster

Dpm B gecorr. = gemeten binding B, gecorrigeerd voor deelmonster, ASB, opbrengst

Totaaltelling = 21803 dpm

5. Berekeningen

Berekening van het % Opbrengst

$$\% \text{ Opbrengst} = \frac{\text{Dpm R gecorr.}}{\text{Dpm T}} \times 100\%$$

Berekening van de teruggevonden concentratie

$$\text{Toegevoegde hoeveelheid} \times \frac{\% \text{ Opbrengst}}{100}$$

Berekening van het % B/Bo

$$\% \text{ B} = \frac{\text{Dpm B gecorr.}}{\text{Dpm R gecorr.}} \times 100\%$$

$$\% \text{ B/Bo} = \frac{\% \text{ B}_s - \% \text{ B}_{ASB}}{\% \text{ B}_{Bo} - \% \text{ B}_{ASB}}$$

Hierin zijn:

Dpm R = getelde dpm opbrengst welke zijn gecorrigeerd voor volume afname

Dpm B = getelde dpm "gebonden" welke zijn gecorrigeerd voor volume

% B = percentage "gebonden" fractie

% B_s = percentage "gebonden" fractie standaardpunt

% B_{ASB} = percentage "gebonden" fractie blanco

% B_{Bo} = percentage "gebonden" fractie nulpunt

% B/Bo = percentage "gebonden" fractie to.v. het nulpunt

Uitzetten standaardcurve

Zet op logitlogpapier tegen elkaar uit de concentratie in pg/100 µl (X-as) en het % B/Bo (Y-as). Zie figuur 3.

Berekening % kruisreactie

Het percentage kruisreactie van een stof wordt berekend door de concentratie DES die 50% B/Bo geeft te vergelijken met de concentratie van die stof die eveneens een % B/Bo geeft van 50.

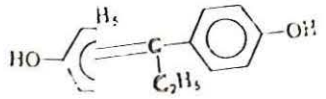
$$\frac{\text{concentratie DES bij 50\% B/Bo}}{\text{concentratie X bij 50\% B/Bo}} \times 100\%$$

X stelt één van de gemeten verbindingen voor.

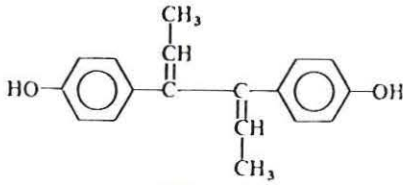
5.1 Tabel: Kruisreactiepercentages

Verbinding	Concentratie bij 50% B/Bo	Kruisreactie
	pg/100 µl	%
Diëthylstilbestrol (DES)	31	-
Diënestrol (DE)	800	3,9
Hexestrol (HEX)	230	13,5
Estradiol (E_2)	<<	<< 0,1
Estriol (E_3)	<<	<< 0,1
Oestron (Ö)	<<	<< 0,1
Trenbolon (TBOH)	<<	<< 0,1
Zeranol (Z)	<<	<< 0,1

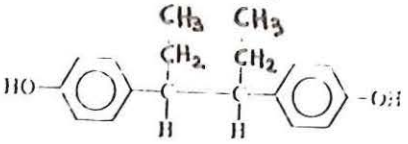
6. Struktuurformules



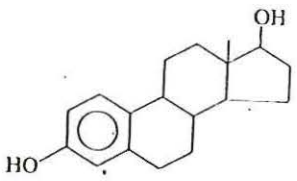
Diëthylstilbestrol
(Trans-p,p'-dihydroxy-diëthylstilbeen)



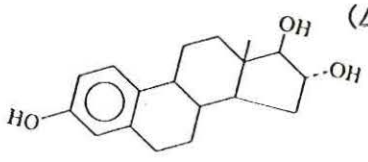
Diënestrol
(Di-parahydroxyphenyl-2,4-hexadiën)



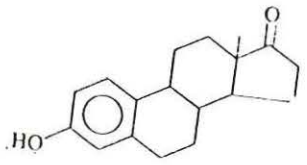
Hexestrol
di (p-Hydroxyphenyl-hexaan)



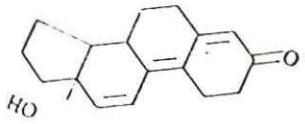
Estradiol (E_2)
($\Delta^{1,3,5(10)}$-Estratriën-3,17 β-diol)



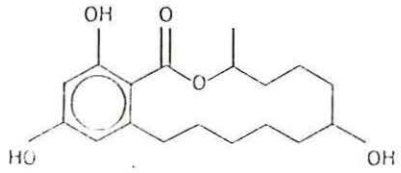
Estriol (E_3)
($\Delta^{1,3,5(10)}$-Estratriën, 3,16 α, 17 β-triol)



Oestron (O)
($\Delta^{1,3,5(10)}$-Estratriën-3,ol-17-on)



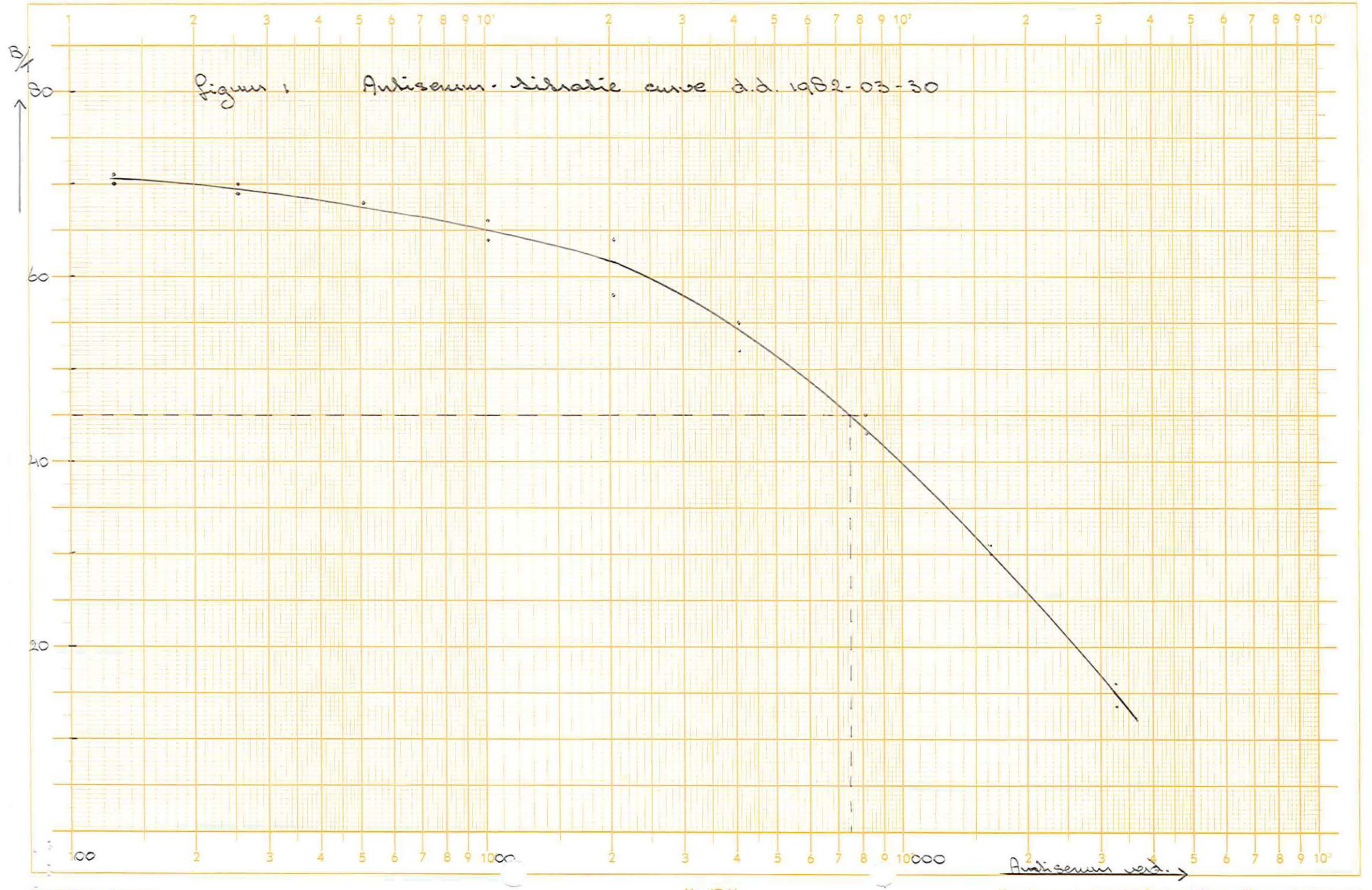
Trenbolon (TBOH)
(4,9,11-Estratriën-17-β-ol-3-on)



Zeranol (Z)
(6-(6,10-dihydroxymdecyl)-β-resorcycliczuur μ-lactone

7. Conclusie

Des te meer een vreemde stof op het antigeen lijkt, des te groter wordt de neiging om met het antiserum een binding aan te gaan.
Hier blijkt dat de beide andere stilbeenderivaten, DE en HEX, neiging vertonen tot een antigeen-antilichaam binding. Voor Diënestrol is dit 3,9% en voor Hexestrol is dit 13,5%.
De overige bepaalde stoffen geven geen binding met het DES-antiserum.



meetpapier - wormer

No. 17 H

X-as log. verdeeld 1-10³ Eenheid 90 mm. Y-as verdeeld in mm.

Figuur 2.

DES standaardlijnen met verschillende As verdunningen.

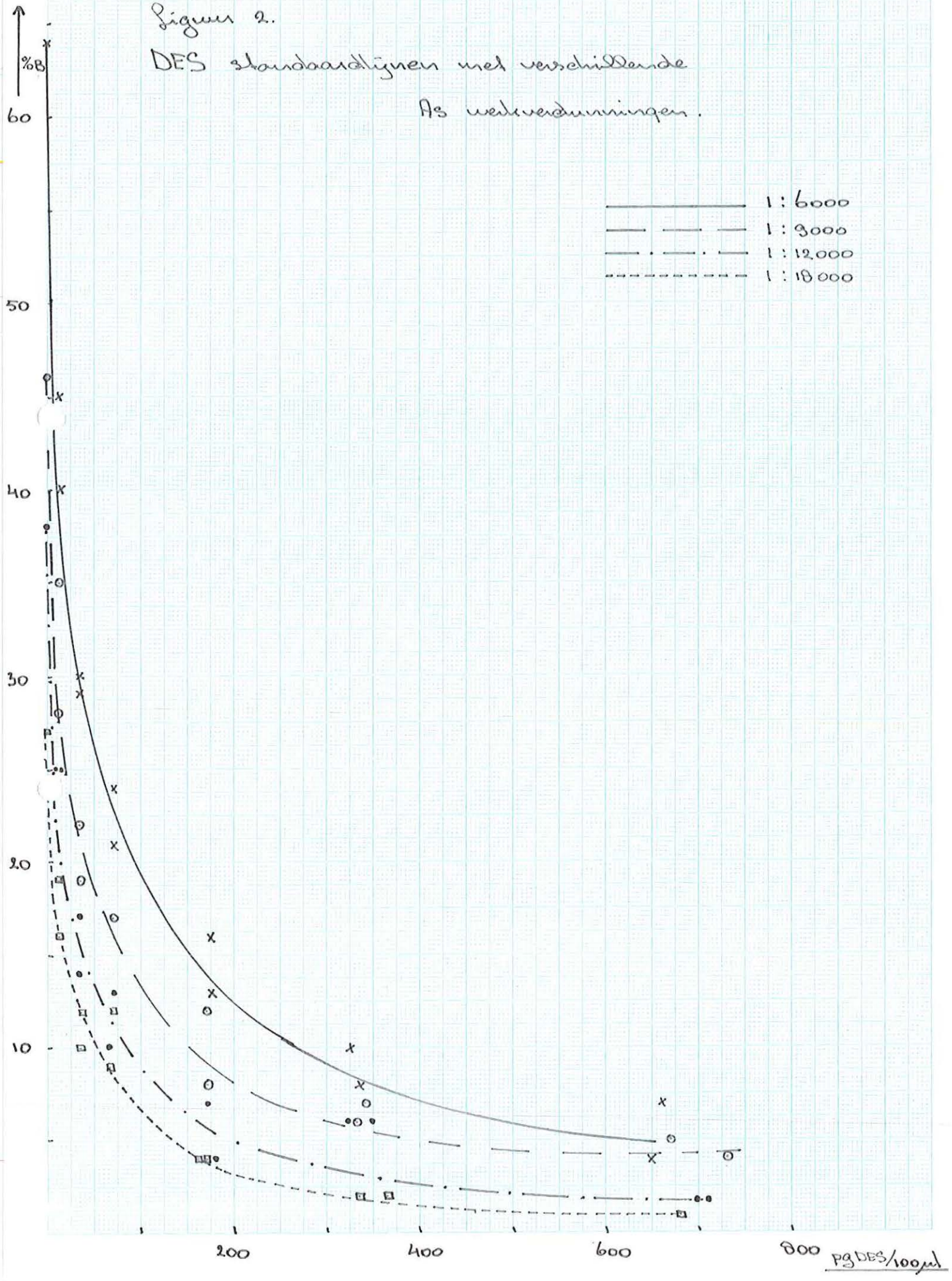


fig. 3 kruisreacties, 1982-05-13

