

LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

STANOVENÍ KONCENTRACE PRODUKTU GENU *Reg-1 α* V SÉRU NOVOU METODOU ELISA

DAVID STEJSKAL^a, MICHAL KARPÍŠEK^b,
MAREK ŠVESTÁK^a a HELENA REUTOVÁ^c

^a Oddělení laboratorní medicíny Nemocnice Šternberk o.z.,
Středomoravská nemocniční a.s., ^b Veterinární a farmaceutická
Univerzita Brno, ^c Biovendor Brno
david.stejskal@nemstbk.cz, michal.karpisek@email.cz,
reutova@biovendor.cz

Došlo 1.10.07, přijato 10.1.08.

Klíčová slova: metabolický syndrom, ELISA, *Reg-1 α* ,
protilátka, akutní koronární syndrom

Úvod

V roce 1984 byl objeven nový gen, který hraje pravděpodobně významnou roli při regeneraci řady tkání¹. Nedávno bylo prokázáno, že tento tzv. *Reg* gen hraje významnou roli v regeneraci tkáně myokardu, kdy byla v experimentu po poškození myokardu zjištěna transkripční aktivace *Reg-1 α* v myokardu jako odpověď na myokardiální stres^{1–3}. Také u experimentálně vyvolaného infarktu myokardu byla zjištěna v cytoplasmě kardiomyocytů zvýšená exprese genu pro *Reg-1 α* (i jeho receptoru) a současně byla u těchto jedinců nalezena vyšší koncentrace *Reg-1 α* proteinu v séru ve srovnání s jedinci s konstrikcí aorty. Je možné, že systém „*Reg*“ hraje významnou roli jako protektivní ukazatel proti účinku akutního srdečního stresu. Vznikla tedy hypotéza, že stanovení proteinu *Reg-1 α* by mohlo být zajímavým ukazatelem přítomnosti vyššího koronárního rizika³.

Experimentální studie také prokázaly, že by *Reg-1 α* mohl být ukazatelem extrémního stresu obecně. Jelikož je obezita, resp. metabolický syndrom významným stresovým stimulem, který vede k řadě tkáňových komplikací (např. kardiovaskulární či cerebrovaskulární choroby, diabetes mellitus, hypertenze, autonomní vegetativní dysfunkce), vznikly proto hypotézy o možném diagnostickém využití stanovení *Reg-1 α* v diagnostice metabolického syndromu.

Naším cílem v předkládané práci byl vývoj, validace a klinické testování soupravy ELISA pro specifické stanovení sérové koncentrace lidského *Reg-1 α* .

Experimentální část

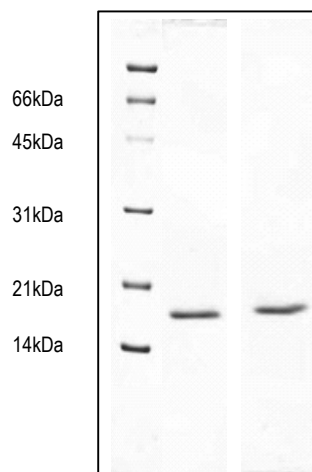
Příprava rekombinantního lidského *Reg-1 α*

Sekvence mRNA *Reg-1 α* byla získána z databáze RefSeq (Accession Number NM_00209); příslušná sekvence byla syntetizována a optimalizována pro *E.coli*. Syntetický gen byl klonován do restričních míst expresního vektoru pET21 (Novagen) a provedena transformace bakteriálního kmene *E.coli* BL21DE3. Produkční kmen byl kultivován při teplotě 37 °C a exprese rekombinantního proteinu byla indukována isopropyl β -D-1-thiogalaktopyranosidem (IPTG, Sigma). Po rozbití produkční kultury ultrazvukem byl ze supernatantu izolován gelovou chromatografií rekombinantní *Reg-1 α* .

Protein byl dialyzován do prostředí 50 mM NaH₂PO₄ (pH 7,2), čistota proteinu analyzována elektroforézou v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (14% homogenní gel, SDS PAGE, obr. 1) a koncentrace bílkoviny stanovena metodou s kyselinou bicinchoninovou (BCA metoda, Sigma, katalogové číslo BCA1-1KT).

Příprava specifických protilátek proti lidskému *Reg-1 α*

Byla připravena králičí protilátka podle imunizačního schématu: dávka vždy 0,2 mg proteinu pro imunizaci králí-



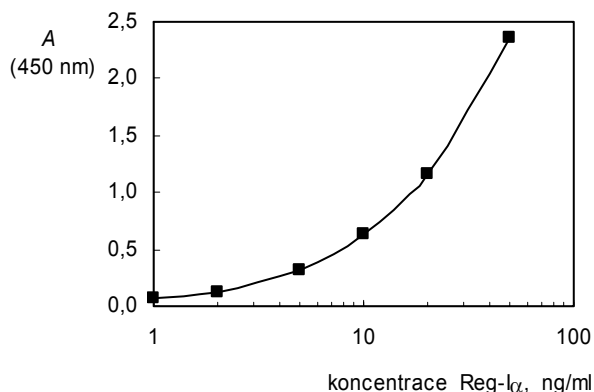
Obr. 1. Čistota rekombinantního lidského *Reg-1 α* byla ověřena elektroforézou (14% homogenní gel, SDS PAGE, metoda: Laemmli, barvení gelu: Coomassie blue). Zleva: 1 – proteinový standard; 2 – rekombinantní lidský *Reg-1 α* v redukčním prostředí; 3 – rekombinantní lidský *Reg-1 α* v neredukčním prostředí. Čistota proteinu je vyšší než 95 %

ka; první dávka byla v kompletním Freundově adjuvans a následně 2 dávky v inkompletním Freundově adjuvans. Z připraveného antiséra byla izolována specifická protilátka imunoafinitní chromatografií na koloně s imobilizovaným rekombinantním Reg-I α , imunosorbent byl připraven podle návodu od výrobce (POROS-AL, Applied Biosystems, katalogové číslo 1-6022-24). Čistota protilátek byla stanovena elektroforézou v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (12% homogenní gel, SDS PAGE), celková koncentrace bílkoviny byla stanovena metodou BCA. Část králičí protilátky byla značena křenovou peroxidasou (Peroxidase activated, Roche, katalogové číslo 11 428 861 001) podle návodu od výrobce.

Vývoj sendvičové ELISA pro stanovení Reg-I α v lidském séru

V mikrotitrační desce (Corning Costar, High Binding, katalogové číslo 52-00-02) bylo vázáno 0,2 μg protilátky/jamku v 0,1 M karbonátovém pufru pH 9,0 (inkubace 12 h při 4 °C). Deska byla poté jednou promyta promývacím roztokem TBS-Tw (0,05 M Tris-HCl; 0,15 M NaCl; pH 7,2; 0,05% (w/v) Tween 20) na promývače Columbus (Tecan, Inc.). Nevyužitá vazebná místa byla zablokována 0,3 ml/jamku roztoku TBS (0,05 M Tris-HCl; 0,15 M NaCl; pH 7,2), 0,5% (w/v) BSA (hovězí sérový albumin), 4% sacharosa a deska byla inkubována 30 min při 25 °C. Po odsátí blokovacího roztoku bylo na desku dávkováno 0,1 ml příslušného standardu nebo ředěného sérového vzorku (všechna měření byla prováděna 2 \times). Následně byla deska inkubována 1 h při laboratorní teplotě (25 °C). Po 3-násobném promytí desky promývacím roztokem (TBS, 0,05% Tween 20, pH 7,2) bylo do všech jamek desky dávkováno 0,1 ml specifické protilátky značené křenovou peroxidasou (0,06 mg l $^{-1}$) a deska opět inkubována 1 h při laboratorní teplotě. Po 3-násobném promytí desky promývacím roztokem bylo do všech jamek desky dávkováno 0,1 ml substrátu TMB (1,2 mM tetrametylbendidin s obsahem 3 mM peroxidu vodíku, KPL, katalogové číslo 52-00-01) a reakční směs inkubována 10 min při laboratorní teplotě (25 °C). Reakce byla zastavena přidáním 0,1 M roztoku kyseliny sírové a vzniklé žluté zbarvení (produkt) bylo změřeno fotometricky při vlnové délce 450 nm. Intenzita žlutého zbarvení je přímo úměrná obsahu analytu ve vzorku. Hodnoty Reg-I α v neznámých vzorcích byly stanoveny z kalibrační křivky (obr. 2), která byla získána vynesemím absorbancí standardů oproti jejich známé koncentraci.

Ředícím roztokem pro standardy a vzorky byl roztok TBS 0,05% Tween 20, 0,05% (w/v) želatina, ředícím roztokem pro protilátku značenou křenovou peroxidasou byl roztok StabilZyme-HRP (SurModics, katalogové číslo SZ02). V testu byla použita sada standardů 50, 20, 10, 5, 2 a 1 μg l $^{-1}$, připravená naředěním rekombinantního lidského Reg-I α . Sérové vzorky byly ředěny 50 \times podle schématu 1 díl vzorku + 49 dílů ředícího roztoku.



Obr. 2. Standardní kalibrační křivka byla sestavena s použitím 4-parametrové funkce

Klinické testování metody ELISA

Byly vyšetřeny tři skupiny osob:

- V první skupině bylo testováno 38 pacientů přijatých na interní oddělení pro podezření na akutní koronární syndrom (AKS). U těchto jedinců byl po příjmu, za 2 a 6 hodin stanoven srdeční troponin I (cTnI, metoda LEIA, přístroj Immulite, výrobce DPC), myoglobin (metoda LAT, přístroj Advia1650, výrobce Denka Seiken), C-reaktivní protein (CRP, metoda LAT, přístroj Advia 1650, výrobce Biovendor) a Reg-I α (ELISA, ELISA linka Marc-Max, výrobce Biovendor). Diagnóza AKS byla sestavena na základě kritérií AHA-ESC/ACC (cit.⁴),
- ve druhé skupině bylo vyšetřeno asymptomatických 60 pacientů ve vysokém kardiovaskulárním riziku (39 mužů, 21 žen). U všech byla provedena jednofotonová emisní počítačová tomografie myokardu (SPECT) po standardizované zátěži. Latentní forma myokardiální ischemie byla definována jako pozitivita nálezu na SPECT. U všech jedinců byla odebrána krev před zátěží, při subjektivním maximu, po 30 a 60 min po ukončení zátěže. V krvi byl stanoven Reg-I α výše uvedenou metodou,
- ve třetí studii bylo vyšetřeno 14 neobézních osob bez známek metabolického syndromu a 15 obézních jedinců s metabolickým syndromem. Metabolický syndrom byl diagnostikován na základě kritérií National Education Program's Adult Treatment Panel III Report (NCEP-ATP) (cit.⁵). U všech osob byl změřen v séru insulin (metoda LEIA, Immulite 2000, výrobce DPC), cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, triglyceridy, kyselina močová, glukosa (enzymové metody, Advia 1650, výrobce Biovendor) a Reg-I α .

Reg-I α byl stanoven ve všech případech ze séra. Po odběru byl každý vzorek ponechán po dobu 30 min

v pokojové teplotě. Poté byly vzorky centrifugovány (10 min, 1100 g, 4 °C) a následně zmrazeny při –80 °C. Reg-Ia byl stanoven ve všech případech do 3 měsíců po odběru materiálu po předchozí adaptaci na pokojovou teplotu (25 °C). Všechny vzorky byly měřeny v duplikátech.

Výsledky a diskuse

Funkční charakteristika ELISA

Nebyla zjištěna zkřížená reaktivita této ELISA s lidskými rekombinantními proteiny Reg-I β (Biovendor); PAP (Biovendor) a Reg-IV (Biovendor) při koncentraci antigenů 50 $\mu\text{g l}^{-1}$. Současně nebyla zjištěna žádná křížová reaktivita v sérech následujících zvířat: králík, koza, ovce, prase, myš, kůň, křeček, tur, kočka, pes a krysa. Silná křížová reaktivita byla naměřena pouze s opičím sérem.

Pro ověření funkčnosti Reg-I α ELISA byla testována také správnost a přesnost metody. Správnost metody byla ověřena metodou standardního přídatku a testem diluční linearitu. Pro test standardního přídatku byly použity vzorky lidského séra od dvou pacientů o původní koncentraci Reg-I α 160 a 265 $\mu\text{g l}^{-1}$, které byly obohaceny o rekombinantní Reg-I α (+250, +500 a +750 $\mu\text{g l}^{-1}$) a otestovány. Průměrný výtěžek byl 101 %. Diluční linearita byla otestována na dvou dalších sérových vzorcích o koncentraci Reg-I α 345 a 595 $\mu\text{g l}^{-1}$. Průměrný výtěžek byl 100,1 %.

Přesnost metody byla testována jako opakovatelnost výsledků u 3 sérových vzorků a vyjádřena jako variační koeficient (CV) v sérii (intra-assay; $n=7$) a reprodukovatelnost mezi sériemi měření (inter-assay; $n=10$). Hodnota variačního koeficientu byla ve všech případech menší než 9 %.

Mez stanovitelnosti metody, představující nejnížší stanovitelnou koncentraci Reg-I α , byla 0,094 $\mu\text{g l}^{-1}$ (tato hodnota je vyjádřením koncentrace Reg-I α , odpovídající absorbanci vypočítané podle vzorce: průměrná hodnota absorbance slepého vzorku ($n=8$) + 3 \times směrodatná odchylka průměru slepého vzorku). Mez detekce vypočítaná podle vzorce: 0,094 \times 50 (ředicí faktor vzorků) byla 4,8 $\mu\text{g l}^{-1}$.

Klinické testování metody ELISA

a) Hodnoty Reg-I α vykazovaly u pacientů s akutním koronárním syndromem nenormální rozložení ($n=7$; medián 773,2 $\mu\text{g l}^{-1}$) a významně se nelišily od hodnot pacientů bez známek AKS ($n=28$; medián 679,7 $\mu\text{g l}^{-1}$; $P=0,67$). Současně hodnoty Reg-I α korelovaly významně s myoglobinem ($r=0,49$; $P<0,01$) a CRP ($r=0,67$; $P<0,01$). Korelace s CRP přetrvávala i po korekci na sérovou hodnotu kreatininu ($r=0,57$; $P<0,01$). Při použití krokové regrese nebyly do mode-

lu jako nezávislé proměnné zahrnutý věk ani myoglobin. Regresní rovnici lze vyjádřit jako:

$$\text{Reg-I} = 8,7 * \text{kreatinin} + 19,4 * \text{CRP} - 965,5 * \text{cTnI} - 354,5$$

(F ratio 22,1; $P<0,01$) (cit. ⁶).

- b) Ve druhé studii mělo 14 osob latentní myokardiální ischémii; u 46 nebyly známky poškození myokardu zjištěny. Obě skupiny se však v hodnotách Reg-I α nelišily ani v jednom z náběrů (průměrné mediány Reg-I α činily 527,2 vs. 552,3 $\mu\text{g l}^{-1}$; $P=0,59$) (cit. ⁷).
- c) Ve třetí studii bylo vyšetřeno 29 osob (18 mužů a 11 žen). 14 z nich byly zdravé osoby (8 mužů, 6 žen), 15 z nich trpělo metabolickým syndromem (9 mužů, 6 žen). Hodnoty Reg-I α v séru se významně nelišily mezi osobami zdravými a jedinci s metabolickým syndromem (mediány 550,7 vs. 442,3 $\mu\text{g l}^{-1}$; $P=0,51$) a korelovaly pozitivně pouze s hodnotami glykémie ($r=0,25$; $P=0,03$) a věku ($r=0,38$; $P<0,01$). Korelace mezi Reg-I α a hodnotou glukosy v séru přetrvávaly i po adjustaci Reg-I α na věk ($r=0,23$; $P<0,01$) (cit. ⁸).

Závěrem ke klinickému testování pro validaci metody v séru lze říci, že nebyly potvrzeny hypotézy o možném rutinním diagnostickém využití Reg-I α v séru v diagnostice metabolického syndromu, obezity nebo myokardiální ischémie. Z prvních výsledků však vyplývá, že by měly následovat další studie, které by měly vysvětlit nalezenou souvislost mezi glykemií a Reg-I α a možná hledat další význam tohoto parametru jako prediktoru předčasné aterosklerózy nebo poruchy glukosové tolerance.

LITERATURA

1. Fukui H., Fujii S., Takeda J., Kayahara T., Sekikawa A., Nanakin A., Suzuki K., Hisatsune H., Seno H., Sawada M., Fujimori T., Chiba T.: *Digestion* 69, 177 (2004).
2. Sanchez D., Gmyr V., Kerr-Conte J., Kloppel G., Zenilman M. E., Guy-Crotte O., Pattou F., Figarella C.: *Pancreas* 29,14 (2004).
3. Kiji T., Dohi Y., Takasawa S., Okamoto H., Nonomura A., Taniguchi S.: *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 289, 277 (2005).
4. Klocke J. F.: *ACC/AHA/ASNC Guidelines for the Clinical Use of Cardiac Radionuclide Imaging. V: ACC/AHA Practice Guidelines* (2003).
5. Grundy S. M., Cleeman C. J. I., Daniels S. R., Donato K. A., Eckel R. H., Franklin B. A., Gordon D. J., Krauss R. M., Savage P. J., Smith S. C., Spertus J. A., Costa F.: *Circulation* 112, 2735 (2005).
6. Stejskal D., Lacnak B., Karpíšek M., Kamínek M.: *Biomed. Papers* 150, 239 (2006).
7. Stejskal D., Karpíšek M., Horáková D., Čížek L., Janoutová G., Janout V.: *Bratisl. Med. J.* 108, 138 (2007).

D. Stejskal^a, M. Karpíšek^b, M. Švesták^a, and H. Reutová^c (^a *Department of Laboratory Medicine, Šternberk Hospital, Šternberk*, ^b *Pharmaceutical and Veterinary University, Brno*, ^c *Biovendor Brno*): **Determination of Serum Concentration of Gene Reg-I α Product by a New ELISA Method**

In recent few years several papers have dealt with the need for a new sensitive test for myocardial ischemia, which would allow an early and efficient therapeutic inter-

vention. A promising laboratory marker seems to be serum Reg-I α . An ELISA method for the Reg-I α determination in serum is described and validated and its diagnostic utility is discussed. However, the serum Reg-I α values in individuals with metabolic syndrome and latent or acute myocardial ischemia did not significantly differ from those in healthy people. First results of clinical testing did not confirm the hypotheses on the use of this serum parameter for diagnosis of acute myocardial or metabolic syndromes.