UNIVERZITET U BEOGRADU
FAKULTET ZA FIZIČKU HEMIJU

RADIOHEMIJA I
NUKLEARNA HEMIJA

Određivanje koncentracije hormona RIA metodom

Zadatak vežbe: *Odrediti ukupan tiroksin (T4) u serumu RIA metodom*

Oprema vežbe:

1. RIA komplet
2. scintilacioni GM brojač
3. centrifuga

Opis vežbe:

RIA-T4 (PEG) je dijagnostička metoda namenjena za kvantittativno određivanje ukupnog tiroksina (T4) u serumu. Ova metoda se primenjuje tek kada se pretpostavlja poremećaj u funkciji štitaste žlezde. Povišene vrednosti T4 mogu se očekivati kod hipertireoza, a snižene vrednosti se mogu javiti kod hipertireoza izazvanih ekstremnim nedostatkom joda. Metoda se zasniva na konkurentnom vezivanju serumskog T4 i radioaktivnog T4 za mali ali određeni broj antigenih determinanti na specifičnim antitelima za T4, pri čemu nastaju obeleženi i neobeleženi imunokompleksi. Obeleženog kompleksa formiraće se toliko manje koliko više ima serumskog T4. Posle završene reakcije i jedan i drugi kompleks se talože polietilenglikolom (PEG), dok slobodni T4 (obeleženi i neobeleženi) kao i slobodna antitela zaostaju u tečnoj fazi. Radioaktivnost istaloženog kompleksa meri se odgovarajućim scintilacionim brojačem. Istovremeno sa uzorcima seruma tretiraju se i standardi koji sadrže T4 precizno određene koncentracije pomoću kojih se formira standardna kriva. Upoređivanjem sa standardnom krivom, određuje se koncentracija T4 u uzorcima seruma. Za eksperiment je korišćeno 18 epruveta obeleženih na sledeći način: 1 i 2 za ukupnu aktivnost (T); 3 i 4 za maksimalno vezivanje; 5-16 za standarde (S1-S6); 17-18 za uzorak seruma nepoznate koncentracije T4(x). U epruvete se reagensi dodaju na sledeći način:

epruveta broj	25µl	25µl	25µl	0,1 ml	0,1 ml
	S. bez T4, standard "0"	standard broj	kontr.s. KS	125-J-T4	anti-T4
1,2				+	+
3,4	+			+	+
5,6		1		+	+
7,8		2		+	+
9,10		3		+	+
11,12		4		+	+
13,14		5		+	+
15,16		6		+	+
17,18			+	+	+

Nakon dodavanja reagensa, sve se inkubira 1čas na 19-25°C, zatim se doda po 1 ml PEG-a u sve epruvete osim u 1 i 2, i sve se centrifugira 15 min. Zatim se odlije supernatant, osuše epruvete i meri radioaktivnost 1min. Rezultate srediti tabelarno:

broj epruvete	R(imp/min)	R^*	R_{sr}^*	$\frac{B}{B_0}\cdot 100\,\%$	oznaka	c [nmol/l]	log c

Nacrtati grafik $\frac{B}{B_0}\cdot 100 = f(\log c)$. Sa grafika odrediti nepoznatu koncentraciju c_x.