CH 7.10.

Dôkaz prítomnosti acetylgestagénov v perirenálnom tuku metódou ELISA

1. URČENIE METÓDY

Je to nepriama kompetitívna enzýmová imunoanalytická metóda na dôkaz prítomnosti acetylgestagénov v perirenálnom tuku súpravou ELISA. Je vhodná na skríningové účely.

2. PRINCÍP METÓDY

Základom testu je reakcia antigén – protilátka. Jamky v ELISA súprave sú potiahnuté antigénmi orientovanými proti anti-acetylgestagénovým protilátkam. K štandardom alebo vzorkám sa pridá MPA enzýmový konjugát a anti-acetylgestagénové protilátky. Voľný a MPA enzýmový konjugát súťažia o naviazanie na väzbové miesta protilátok acetylgestagénov. Súčasne anti-acetylgestagénové protilátky sú tiež viazané imobilizovanými zachytenými protilátkami. Po inkubácii sa mikrotitračné jamky premyjú, aby sa odstránil nenaviazaný enzýmový konjugát. Do jamiek sa pridá enzýmový substrát a chromogén a platnička sa inkubuje 30 minút pri laboratórnej teplote v tme. Naviazaný enzýmový konjugát zmení bezfarebný chromogén na modrý produkt. Prídavok stop roztoku vedie k zmene farby z modrej na žltú. Zmeria sa absorbancia pri 450 nm. Absorpcia je nepriamo úmerná koncentrácii acetylgestagénov v štandarde alebo vo vzorke.

3. POMÔCKY

3.1. PRÍSTROJE A ZARIADENIA

- Mraznička (- 25 ± 2)^{0}C
- vodný kúpeľ (40 ± 2) °C
- homogenizátor ULTRA TURRAX (IKA)
- pH meter
- chladená centrifúga (-25°C) (HETTICH ROTANTA)
- termoblok (60 ± 2 °C) s koncentrátorom vzoriek napojeným na N_2
- extrakčná jednotka pre SPE kolónky
- separačné SPE kolónky C18
- mikropipety s nastaviteľným objemom - jednokanálové, viackanálové
- ELISA reader spektrofotometer (450 nm) + PC (DYNATECH)

3.2. CHEMIKÁLIE A ROZTOKY

- petroléter p.a. Merck
- metanol p.a. Merck
- tris-(hydroxymetyl)-aminometán p.a. Merck
- kyselina chlorovodíková (HCl) p.a. Merck
- Tween-20

3.3. PRÍPRAVA ROZTOKOV

- **20mM Tris-HCl, pH 8.5 / metanol (80/20 v/v)** – 2,42 g tris-(hydroxymetyl)-aminometán rozpustiť v 700 ml dest. H_2O, pridať 200 ml 100% metanolu, upraviť pH na 8,5 s 5M HCl a doplniť dest. vodou do 1000 ml
- **premývací pufor 0,05% Tween-20** – 0,5g Tween-20 v 1000 ml dest. H_2O, pripravovať vždy čerstvý!
- **40% metanol –** 40 ml metanolu + 60ml H_2O
- **80% metanol –** 80 ml metanolu + 20 ml H_2O

4. BEZPEČNOSŤ PRI PRÁCI

Všetky extrakčné a čistiace kroky uskutočniť pod ventilačným zariadením s odťahom pri použití ochranných rukavíc.

5. PRACOVNÝ POSTUP

5.1. PRÍPRAVA VZORIEK

- navážiť 1 g perirenálneho tuku
- pridať 15 ml petroléteru
- extrahovať vo vodnom kúpeli cez noc pri 40°C
- vymraziť kyvety centrifúgy pri –25°C
- centrifugovať 15 min. / 2000g / -15°C
- supernatant preniesť do čistej skúmavky
- supernatant odpariť pri 60°C pod prúdom N_2
- odparok rozpustiť v 2 ml 100% metanolu
- miešať na vortexe 20 s
- vymraziť v mrazničke 2 hod. 30 min. pri –25°C (spolu s kyvetami centrifúgy)
- centrifugovať 5 min. / 2000g / -15°C
- supernatant zliať do čistej skúmavky
- zriediť supernatant 5 ml dest. H_2O
- purifikovať na kolónke C18

Purifikácia na kolónkach C18

- vytemperovať vzorky a reagencie na lab. teplotu
- nastaviť prietok na 1 kvapku/s
- premyť kolónku 2 × 1 ml 100% metanolu
- premyť kolónku 2 × 1 ml 20mM Tris-HCl, pH 8.5 / metanol (80/20 v/v)
- aplikovať vzorku
- premyť kolónku 2 × 1 ml 20mM Tris-HCl, pH 8.5 / metanol (80/20 v/v)
- premyť kolónku 2 × 1 ml 40% metanolu
- vysušiť kolónku 2 min.
- eluovať vzorku 1 ml 80% metanolu
- zriediť eluát 1:1 dest. H_2O (tesne pred nanášaním na platničku!)

5.2. PRÍPRAVA MERANIA: ELISA – Acetylgestagene

- platničku a všetky reagencie vytemperovať na laboratórnu teplotu
- označiť protokol a platničku
- počas práce zabrániť vysušeniu jamôk v mikroplatničke!
- zamedziť prístupu priameho slnečného svetla počas jednotlivých inkubačných periód!
- enzymatický konjugát opatrne premiešať, zriediť 1:11 (1+10) pufrom zo súpravy
- protilátku opatrne premiešať, zriediť 1:11 (1+10) pufrom zo súpravy

5.3. POSTUP ELISA

- Pri každom meraní nanášať na platničku 6 štandardov zo súpravy (koncentrácie: 0µg/kg; 0,15 µg/kg; 0,45 µg/kg; 1,35 µg/kg; 4,05 µg/kg; 12,15 µg/kg), pripravené vzorky a pozitívnu a negatívnu kontrolu.
  Pozitívnu aj negatívnu kontrolu pripraviť z interného referenčného materiálu s prídavkom štandardu o koncentrácii 1 µg/kg, resp. 0 µg/kg rovnakým postupom ako je postup spracovania vzoriek.
- do každej jamky pridať 20 µl štandardu, pripravenej vzorky a pozitívnu a negatívnu kontrolu (vzorky aj štandardy nanášame duplicitne, paralelky)
- do každej jamky pridať 50 µl zriedeného enzymatického konjugátu
- do každej jamky pridať 50 µl zriedenej protilátky
- opatrne premiešať, inkubovať 2 hod. pri laboratórnej teplote v tme
- odsať obsah platničky na papierovej vate
- premyť 3 × 250 µl premývacieho pufru (0,05% Tween-20, pripravovať vždy čerstvý!)
- odsať na papierovej vate
- do každej jamky pridať 50 µl substrátu
- do každej jamky pridať 50 µl chromogénu
- dobre premiešať, inkubovať 30 min pri lab. teplote v tme
- pridať 100 µl STOP činidla, premiešať, merať absorbanciu pri 450 nm (odčítať do 60 min.)

6. VYHODNOTENIE NAMERANÝCH ÚDAJOV

Koncentráciu medroxyprogesteron acetátu vo vzorke (v µg/kg) vypočítanú z kalibračnej krivky treba násobiť zrieďovacím faktorom. Zrieďovací faktor pre vzorky perirenálneho tuku = **2**, ak bol dodržaný pracovný postup.
Priebeh kalibračnej krivky je priložený ku každej súprave, ako aj ku každému výsledku merania vyhodnotená softvérom Ridasoft alebo Revelation.

7. LITERATÚRA

7.1. RIDASCREEN® Acetylgestagene – Enzyme immunoassay for the quantitative analysis of Medroxyprogesterone acetate and other acetylgestagenes, R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany