CH 7.1.

Dôkaz prítomnosti stilbénov v moči a vo svale metódou ELISA

1. URČENIE METÓDY

Je to nepriama kompetitívna enzýmová imunoanalytická metóda na dôkaz prítomnosti stilbénov (diethylstilbestrol, dienestrol, hexestrol) v moči a vo svale súpravou ELISA. Je vhodná na skríningové účely.

2. PRINCÍP METÓDY

Základom testu je reakcia antigén – protilátka. Jamky v ELISA súprave sú potiahnuté prečistenými ovčími antigénmi na králičí IgG. K štandardom alebo vzorkám sa pridá diethylstilbestrol enzýmový konjugát a anti-diethylstilbestrol protilátka. Po dvojhodinovej inkubácii pri 4 °C 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. Prídavok stop roztoku vedie k zmene farby z modrej na žltú. Zmeria sa absorbancia pri 450 nm. Absorpcia je nepriamo úmerná koncentrácii diethylstilbestrolu v štandarde alebo vo vzorke.

3. POMÔCKY

3.1. PRÍSTROJE A ZARIADENIA

- vodný kúpeľ (37 ± 2) °C
- pH meter
- homogenizátor Ultra Turrax
- trepačka
- centrifúga
- termoblok (60 ± 2) °C s koncentrátorom vzoriek napojeným na N_2
- extrakčná jednotka pre SPE
- SPE kolónky C18
- mikropipety s nastaviteľným objemom jednokanálové, viackanálové
- ELISA reader spektrofotometer (450 nm) + PC
- váhy

3.2. CHEMIKÁLIE A ROZTOKY

- terciálny butylmetyléter p.a.
- petroléter p.a.
- dichlormetán p.a.
- metanol p.a.
- glukuronidáza/arylsulfatáza of Helix pomatia
- kyselina fosforečná (H_3PO_4) p.a.
- kyselina chlorovodíková (HCl) p.a.
- kyselina octová (CH_3COOH) p.a.
- hydroxid sodný (NaOH) p.a.

- octan sodný (CH_3COONa) p.a.
- Tris (tris-(hydroxymetyl)-aminometan) p.a.
- dihydrogenfosforečnan sodný monohydrát ($NaH_2PO_4 \times H_2O$) p.a.
- hydrogenfosforečnan disodný dihydrát ($Na_2HPO_4 \times 2H_2O$) p.a.
- chlorid sodný (NaCl) p.a.
- Tween 20

3.3. PRÍPRAVA ROZTOKOV

- **50 mM acetátový pufor, pH 4,8** – 4,1 g CH_3COONa rozpustiť v destilovanej H_2O, upraviť pH pomocou 20% CH_3COOH na 4,8 a doplniť objem na 1000 ml
- **20 mM Tris-HCl, pH 8,5** – 2,42 g Tris rozpustiť v destilovanej H_2O, upraviť pH pomocou HCl na 8,5, doplniť objem na 1000 ml
- **20 mM Tris-HCl, pH 8,5 / metanol (80/20 v/v)** – 800 ml 20 mM Tris-HCl Zmiešať s 200 ml 100% metanolu
- **67 mM PBS pufor, pH 7,2** – 1,79 g $NaH_2PO_4 \times H_2O$ + 9,61 g $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$ + 8,7 g NaCl rozpustiť v destilovanej H_2O, doplniť objem na 1000 ml a upraviť pH na hodnotu 7,2
- **6 M H_3PO_4** – 20 ml koncentrovanej H_3PO_4 (85%) + 30 ml destilovanej H_2O
- **1 M NaOH** – 1 g NaOH rozpustiť v destilovanej H_2O a doplniť na objem 25 ml
- **20 mM PBS-Tween premývací pufor, pH 7,2 –** 0,55 g $NaH_2PO_4 \times H_2O$ + 2,85 g $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$ + 9 g NaCl + 2 kvapky Tween 20 rozpustiť v destilovanej vode, upraviť pH na hodnotu 7,2 a doplniť objem na 1000ml

4. BEZPEČNOSŤ PRI PRÁCI

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

5. PRACOVNÝ POSTUP

Po zaevidovaní vzoriek do laboratória vzorky uložiť do mrazničky. Pred prípravou vzoriek nechať vzorky vytemperovať na laboratórnu teplotu a postupovať podľa postupu.

5.1. PRÍPRAVA VZORIEK

A) Príprava vzorky – moč

- zriediť 0,5 ml moču 3 ml 50 mM acetátového pufra (pH 4,8)
- pridať 8 µl glukuronidázy/arylsulfatázy of *Helix pomatia*
- hydrolýza 3 hod. pri 37 °C alebo cez noc pri laboratórnej teplote
- purifikácia na kolónkach C18
- vytemperovať vzorky a reagencie na laboratórnu teplotu, nastaviť prietok na 1 kvapka/s
- premyť kolónku 3 ml 100% metanolu
- premyť kolónku 2 ml 20 mM Tris-HCl, pH 8,5 / metanol (80/20 v/v)
- aplikovať vzorku
- premyť kolónku 2 ml 20 mM Tris-HCl, pH 8,5 / metanol (80/20 v/v)
- premyť kolónku 3 ml 40% metanolu
- vysušiť kolónku, 2 min pod vákuom

- eluovať vzorku 1 ml 80% metanolu do čistej skúmavky, rýchlosťou cca 15 kvapiek za minútu (zbytky eluátu vytlačiť z kolónky pozitívnym tlakom alebo vákuom)*
- eluát zriediť (1+1) s 80% metanolom
- zriedený eluát riediť (1+1) s destilovanou vodou, na platničku sa nanáša 20 µl

B) Príprava vzorky – sval

- odstrániť tuk, šľachy, zomlieť vzorku na mäsovom mlynčeku
- 5 g pomletej vzorky homogenizovať s 10 ml 67 mM PBS pufra, pH 7,2
- 3 g homogenátu extrahovať na trepačke s 8 ml terc. butylmetyléteru 20 min.
- centrifugovať 10 min. / 3000g / pri (20-25) °C
- supernatant preniesť do čistej skúmavky (so zábrusom)
- zopakovať extrakciu s ďalšími 8 ml terc. butylmetyléteru
- spojené supernatanty odpariť pri 60 °C pod prúdom N_2
- odparok rozpustiť v 1 ml 70% metanolu, pridať 3 ml petroléteru, zhomogenizovať 15s (krátko scentrifugovať), odsať petroléterovú frakciu - vyhodiť
- metanolický supernatant odpariť pri 60 °C pod prúdom N_2
- odparok rozpustiť v 1 ml dichlormetánu
- pridať 3 ml 1 M NaOH, extrahovať 10 minút na trepačke
- centrifugovať 5 min. / 2000g / pri (20-25) °C
- vrchnú vodnú fázu odobrať do čistej skúmavky
- neutralizovať 300 µl 6 M kyseliny fosforečnej
- purifikovať na kolónke C18
- vytemperovať vzorky a reagencie na laboratórnu teplotu, nastaviť prietok na 1 kvapka/s
- premyť kolónku 3 ml 100% metanolu
- premyť kolónku 2 ml 20 mM Tris-HCl, pH 8,5 / metanol (80/20 v/v)
- aplikovať vzorku
- premyť kolónku 2 ml 20 mM Tris-HCl, pH 8,5 / metanol (80/20 v/v)
- premyť kolónku 3 ml 40% metanolu
- vysušiť kolónku, 2 min pod vákuom
- eluovať vzorku 1 ml 80% metanolu do čistej skúmavky rýchlosťou cca 15 kvapiek za minútu (zbytky eluátu vytlačiť z kolónky pozitívnym tlakom alebo vákuom)*
- eluát zriediť (1+1) s 80% metanolom
- zriedený eluát riediť (1+1) s destilovanou vodou, na platničku sa nanáša 20 µl

5.2. PRÍPRAVA MERANIA: ELISA - Diethylstilbestrol

- súpravu skladovať v chladničke, pred použitím 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!

- Enzýmový konjugát – koncentrát (červený vrchnák)
  Pred riedením premiešať, riediť 1 + 10 s pufrom zo súpravy
- Anti – DES- protilátka – koncentrát (čierny vrchnák)
  Premiešať, riediť v pomere 1 + 10 s pufrom zo súpravy

- Premývací pufor (washing buffer):
  20 mM PBS-Tween pufor, pH = 7,2 - príprava v kap.3.3., pripraviť deň pred použitím

5.3. POSTUP ELISA – DES

Pripravené prečistené vzorky moču , svalu sa vytemperujú na laboratórnu teplotu a upravia podľa príslušného postupu pre moč resp. sval. Z nich sa nanáša na platničku 20µl.

- Do jamiek na platničke naniesť 20 µl štandardov a pripravených vzoriek (každé duplicitne)
- Pridať 50 µl zriedenej anti – DES – protilátky do každej jamky. Premiešať jemne krúživým pohybom a inkubovať cez noc pri (2 – 8) °C v chladničke.
- Pred pokračovaním treba ráno platničku aj ostatné reagencie vytemperovať na laboratórnu teplotu (20 – 25) °C približne 30 minút.
- Vyliať kvapalinu z platničky a priložiť na savý materiál, aby sa kvapalina kompletne odstránila z jamiek platničky. Naplniť všetky jamky 250 µl premývacieho pufra a opäť vyliať kvapalinu z jamiek. Zopakovať ešte 2x.
- Pridať 50 µl zriedeného enzýmového konjugátu na dno každej jamky, premiešať jemne platničku a inkubovať 1 hodinu pri laboratórnej teplote v tme.
- vyliať kvapalinu z platničky a priložiť na savý materiál, aby sa kvapalina kompletne odstránila z jamiek platničky. Naplniť všetky jamky 250 µl premývacieho pufra a opäť vyliať kvapalinu z jamiek. Zopakovať ešte 2x.
- Pridať 50 µl substrátu a 50 µl chromogénu do každej jamky, premiešať jemne krúživým pohybom a inkubovať 30 minút pri laboratórnej teplote (20 – 25)°C v tme.
- Pridať 100 µl stop činidla do každej jamky. Jemne premiešať a merať absorbanciu pri 450 nm. Odčítať do 30 minút od pridania stop činidla.

6. VYHODNOTENIE NAMERANÝCH ÚDAJOV

Priebeh kalibračnej krivky je priložený ku každej súprave, ako aj ku každému výsledku merania. Koncentráciu dietylstilbestrolu vo vzorke (v µg/l, resp. µg/kg) vypočítanú z kalibračnej krivky treba násobiť zrieďovacím faktorom.
Zrieďovací faktor pre vzorky moču = **8**,
pre sval = **4**, ak bol dodržaný pracovný postup.
Meranie je platné ak A(zero štandardu) pri 450 nm > 0,6.

7. LITERATÚRA

7.1. RIDASCREEN® DES – Enzyme immunoassay for the quantitative analysis of diethylstilbestrol, R-Biopharm GmbH, Germany