CH 7.5. Dôkaz prítomnosti boldenonu v moči metódou ELISA

1. URČENIE METÓDY

Je to kompetitívne enzymoimunoanalytické stanovenie na dôkaz prítomnosti boldenonu v moči, vhodná ako skríningová metóda.

2. PRINCÍP METÓDY

Mikrotitračná platnička je dodávaná potiahnutá protilátkami boldenonu. Boldenon (antigén) ak je prítomný v štandarde alebo vo vzorke konkuruje boldenonu značenému chrenovou peroxidázou (enzýmovo značený antigén) pre limitovaný počet miest protilátok na platničke. Po inkubácii pri laboratórnej teplote prebehne konkurenčná reakcia a mikrotitračná platnička sa potom premyje , aby sa odstránili prebytočné reagencie. Do jamiek sa pridá enzýmový substrát a platnička sa inkubuje. Počas inkubácie sa vyvíja sfarbenie, farebná reakcia sa zastaví prídavkom stop roztoku, čo vedie k zmene farby z modrej na žltú. Vykoná sa meranie absorbancie pri 450 nm.

3. POMÔCKY

3.1. PRÍSTROJE A ZARIADENIA

- centrifúga
- mikropipety s nastaviteľným objemom jednokanálové, viackanálové
- ELISA reader spektrofotometer (450 nm) + PC

3.2. CHEMIKÁLIE A ROZTOKY

- destilovaná voda
- všetky potrebné roztoky sú dodávané v ELISA súprave

4. BEZPEČNOSŤ PRI PRÁCI

Všetky extrakčné a čistiace kroky sa uskutočňujú 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

- centrifugovať moč 10 min, 4000 g, 20 °C
- vzorku zriediť 10 krát, 50 µl moču + 450 µl zriedeného diluent/wash pufru zo súpravy

5.2. PRÍPRAVA MERANIA: ELISA – Boldenon

- platničku a všetky reagencie vytemperovať na laboratórnu teplotu, súpravu skladovať v chladničke
- označiť protokol a platničku
- počas práce zabrániť vysušeniu jamôk v mikroplatničke!
- zamedziť prístupu priameho slnečného svetla počas jednotlivých inkubačných periód!
- diluent/wash pufor: obsah vialky zriediť s 970 ml deionizovanou vodou, pri skladovaní v chladničke je stály 30 dní
- enzýmový konjugát: 20 µl konjugátu zriediť so 4 ml diluent/wash pufra – stačí na 4 stripy

5.3. POSTUP ELISA

- Pri každom meraní nanášať na platničku 6 štandardov zo súpravy (koncentrácie: 0µg.l^{-1}; 0,11 µg.l^{-1};0,23 µg.l^{-1}; 0,6 µg.l^{-1}; 1,0 µg.l^{-1}; 5,2 µg.l^{-1}), pripravené vzorky a pozitívnu a negatívnu kontrolu.
- Pozitívnu aj negatívnu kontrolu pripraviť z interného referenčného materiálu s prídavkom štandardu o koncentrácii 0,5 µg.l^{-1}, resp. 0 µg.l^{-1} rovnakým postupom ako je postup spracovania vzoriek
- Do každej jamky pridať 75 µl assay pufru zo súpravy
- Do každej jamky pridať 25 µl štandardu, pripravenej vzorky (vzorky aj štandardy nanášať duplicitne - paralelky), pozitívnu a negatívnu kontrolu
- Do každej jamky pridať 25 µl zriedeneho konjugátu
- Dobre premiešať, prekryť s parafilmom a inkubovať 1 hodinu pri laboratórnej teplote (20°C až 25 °C)v tme. Potom obsah platničky vyliať.
- Premyť 6 × 250 µl diluent/wash pufrom v 10 – 15 min intervaloch
- Odsať na papierovej vate
- Do každej jamky pridať 125 µl substrátu
- Dobre premiešať, inkubovať 20 min pri laboratórnej teplote v tme
- Pridať 100 µl STOP činidla, premiešať, merať absorbanciu pri 450 nm (odčítať do 10 min.)

6. VYHODNOTENIE NAMERANÝCH ÚDAJOV

Priebeh kalibračnej krivky vyhodnotíme so software REVEL. Koncentráciu boldenonu vo vzorke (v µg.l^{-1}) vypočítanú z kalibračnej krivky treba násobiť zrieďovacím faktorom.
Zrieďovací faktor pre vzorky moču = **10**, ak bol dodržaný pracovný postup.

7. LITERATÚRA

7.1 RANDOX – Boldenone, For the quantitative in vitro determination of Boldenone in urine and serum, Randox Laboratories Ltd, United Kingdom