CH 7.2.

Dôkaz prítomnosti 19-nortestosteronu v moči a vo svale metódou ELISA

1. URČENIE METÓDY

Je to nepriama kompetitívna enzýmová imunoanalytická metóda na dôkaz prítomnosti rezíduí 19-nortestosterónu ako 17-β-19-nortestosterónu a 17-α-19-nortestosterónu a 19-norandrostendionu 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. Do potiahnutých jamiek sa pridajú špecifické protilátky (králičí anti-17-β-19-nortestosterone), enzýmovo značený nortestosterón (enzýmovo konjugovaný) a štandardy nortestosterónu alebo vzorky, za čím nasleduje inkubačný krok. Špecifické protilátky sa naviažu na imobilné králičie antigény a v tom istom čase nortestosterón (prítomný v štandarde alebo vo vzorke) a enzýmovo značený nortestosterón si konkurujú navzájom v obsadzovaní špecifických miest (kompetitívna enzýmová imunoanalýza). Po inkubácii a odstránení nadbytku konjugátu premytím sa pridá ešte substrát (tetramethylbenzidín – TMB), s ktorým konjugovaný enzým zreaguje na farebný derivát substrátu. Intenzita sfarbenia je nepriamo úmerná hladine naviazanej špecifickej protilátky a dá sa kvantifikovať fotometricky pri 450 nm.

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 kolonky C18
- mikropipety s nastaviteľným objemom jednokanálové, viackanálové
- ELISA reader spektrofotometer (450 nm) + PC
- váhy

3.2. CHEMIKÁLIE A ROZTOKY

- terciálny butylmetyléter p.a.
- metanol p.a.

- glukuronidáza/arylsulfatáza *Helix pomatia*
- kyselina chlorovodíková (HCl) p.a.
- kyselina octová (CH_3COOH) 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.

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, doplniť objem na 1000 ml
- **200 mM Tris-HCl, pH 8,5** – 24,2 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)** – 100 ml 200 mM zásobného roztoku zmiešať so 700 ml destilovanej H_2O a 200 ml 100% metanolu
- **20 mM PBS pufor, pH 7,2** – 0,55 g $NaH_2PO_4 \times H_2O$ + 2,85 g $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$ + g NaCl rozpustiť v dest. H_2O, doplniť objem na 1000 ml
- **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
- **dilučný pufor na vzorky/Tween (SDBT+)**
  Rozpustiť v 1000 ml destilovanej vody:
  1,15g Na_2HPO_4
  0,20g KH_2PO_4
  0,20g KCl
  30,0g NaCl
  0,5 ml Tween 80
  10g BSA (Sigma A7030)

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 *Helix pomatia*
- hydrolýza 3 hodiny pri 37 °C (alebo cez noc pri laboratórnej teplote)
- purifikácia na kolónkach C18

- vytemperovať vzorky a reagencie na laboratórnu teplotu, prietok 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 3 min
- eluovať vzorku 1 ml 80% metanolu
- eluát odpariť do sucha pri 60 °C pod prúdom dusíka
- odparené rezíduá uchovávať v mrazničke max. 6 mesiacov
- tesne pred nanášaním na platničku odparky rozpustiť v 0,5ml dilučného pufra na vzorky Tween (SDBT+), dôkladne premiešať na vortexe
- 50 µl tohto roztoku nariediť s 950 µl SDBT+ a z takto nariedených vzoriek nanášať na platničku 2 x 50 µl.

B) Príprava vzorky – sval

- odstrániť tuk, zomlieť vzorku na mäsovom mlynčeku, alebo pokrájať na malé kúsky
- 10 g pomletej vzorky homogenizovať s 10 ml 67 mM PBS pufra, pH 7,2
- 2 g homogenátu extrahovať s 5 ml terc. butylmetyléteru 30 min.
- centrifugovať 10 min. / 3000g / pri (10 až 15) °C
- supernatant preniesť do čistej skúmavky (so zábrusom)
- supernatant odpariť pri 60 °C pod prúdom N_2
- odparok rozpustiť v 1 ml 80% metanolu
- pridať 2 ml 20 mM PBS pufru, pH 7,2
- purifikovať na kolónke C18
- vytemperovať vzorky a reagencie na laboratórnu teplotu, prietok 1 kvapka/s
- premyť kolónku 3 ml 100% metanolu
- premyť kolónku 2 ml 20 mM PBS pufra, pH 7,2
- aplikovať vzorku
- premyť kolónku 2 ml 40% metanolu
- vysušiť kolónku 3 min
- eluovať vzorku 1 ml 80% metanolu
- eluát odpariť do sucha pri 60 °C, pod prúdom dusíka
- odparené rezíduá uchovávať v mrazničke max. 6 mesiacov
- tesne pred nanášaním na platničku odparky rozpustiť v 0,5ml dilučného pufra na vzorky Tween (SDBT+), dôkladne premiešať na vortexe
- 50 µl tohto roztoku nariediť s 950 µl SDBT+ a z takto nariedených vzoriek nanášať na platničku 2 x 50 µl.

5.2. PRÍPRAVA MERANIA: ELISA - 19-Nortestosterone

- 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!

- substrátový roztok je pripravený na použitie, po vytemperovaní skontrolovať obsah, pretože pri skladovaní pri 4 °C sa zráža!
- enzymatický konjugát opatrne premiešať, zriediť so 4 ml dilučného pufra, **uložiť do tmy až do použitia**.
- protilátku zriediť so 4 ml dilučného pufra, dôkladne premiešať
- premývací (rinsing) pufor nariediť tesne pred použitím 20 x

5.3. POSTUP ELISA

- Pri každom meraní nanášať na platničku 6 nariedených štandardných roztokov: (koncentrácie: 0 µg/l; 0,0625 µg/l; 0,125 µg/l; 0,25 µg/l; 0,50 µg/l; 1,0 µg/l), pripravené vzorky a pozitívnu a negatívnu kontrolu.
- Negatívnu aj pozitívnu kontrolu pripraviť z interného referenčného materiálu s prídavkom štandardu o koncentrácii 0, 0,5 µg/l; resp. 0, 0,5 µg/kg, spracovať rovnakým postupom ako je postup spracovania vzoriek
- na platničku naniesť 2x (A1, B1)**100 µl** dilučného pufra, 2x 50 µl dilučného pufra (zero štandardu), duplicitne 50 µl štandardov, 50 µl zriedených vzoriek
- do každej jamky okrem A1, B1 pridať 25 µl zriedeného konjugátu
- do každej jamky okrem A1, B1 pridať 25 µl protilátky
- dobre premiešať, inkubovať 1 hodinu v chladničke (2 - 8) °C v tme
- vybrať platničku z chladničky a nechať aspoň 10 min. temperovať
- vyliať obsah platničky , odsať na papierovej vate
- premyť 3 × 300 µl premývacieho (rinsing) pufra, po vyliatí vždy odsať na papierovej vate
- do každej jamky pridať 100 µl substrátu
- dobre premiešať, inkubovať 30 min pri laboratórnej teplote (20 – 25) °C, v tme
- pridať 100 µl STOP činidla, premiešať, merať absorbanciu pri 450 nm (odčítať do 30 min)

6. VYHODNOTENIE NAMERANÝCH ÚDAJOV

Priebeh kalibračnej krivky je priložený ku každej súprave, ako aj ku každému výsledku merania. Koncentráciu 19-nortestosteronu vo vzorke (v µg/l, resp. µg/kg) vypočítanú z kalibračnej krivky treba násobiť zrieďovacím faktorom.
Zrieďovací faktor pre vzorky moču = **2**,
pre sval = **1**, ak bol dodržaný pracovný postup.

Meranie je platné ak A(zero štandardu) pri 450 nm > 0,6.

7. LITERATÚRA

7.1. RIDASCREEN® 19-Nortestosteron – Enzyme immunoassay for the quantitative analysis of 19-Nortestosterone, R-Biopharm GmbH, Germany
7.2. Nortestosterone - Enzyme immunoassay for the quantitative analysis of nortestosterone, Laboratory of Hormonology, Belgium
7.3. 19 – Nortestosterone A microtitre plate based competitive enzyme immunoassay for screening and quantitative analysis of urine samples on the presence of 19-Nortestosterone residues, Europroxima