CH 7.3.

Dôkaz prítomnosti zeranolu a jeho metabolitov v moči a vo svale metódou ELISA

1. URČENIE METÓDY

Je to nepriama kompetitívna enzýmová imunoanalytická metóda na dôkaz prítomnosti zeranolu v moči a vo svale súpravou ELISA. Je vhodná na skríningové účely.

2. PRINCÍP METÓDY

Základom testu je reakcia protilátka – zeranol/zearalenone. Protilátka je vysoko špecifická pre obe anabolické zložky zeranolu a ich metabolity. 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

- váhy
- 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
- separačné kolonky C18 na SPE
- mikropipety jednokanálové, viackanálové
- ELISA reader spektrofotometer (450 nm) + PC

3.2. CHEMIKÁLIE A ROZTOKY

- terciárny butylmetyléter p.a.
- metanol p.a.
- β-glukuronidáza from Escherichia coli
- kyselina octová (CH_3COOH) p.a.
- octan sodný (CH_3COONa) p.a.
- dihydrogenfosforečnan sodný monohydrát ($NaH_2PO_4 \times H_2O$) p.a.
- hydrogenfosforečnan disodný dihydrát ($Na_2HPO_4 \times 2H_2O$) p.a.
- kyselina chlorovodíková HCl, p.a.
- chloroform, p.a.

- hydroxid sodný, p.a.
- dihydrogenfosforečnan draselný monohydrát KH_2PO_4 x H_2O p.a.
- hydrogenfosforečnan didraselný dihydrát K_2HPO_4 x $2H_2O$ p.a.
- tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
- chlorid sodný NaCl, p.a.
- NaOH, p.a.

3.3. PRÍPRAVA ROZTOKOV

- **20 mM Tris-HCl pH 8.5 / metanol 80:20,**– 2,42 g Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan do 700 ml dest. vody + 200 ml methanol (100%), upraviť pH na 8,5 pomocou HCl a doplniť do 1000 ml dest. vodou
- **20 mM PBS pufor, pH 7.2** – 0.55 g $NaH_2PO_4 \times H_2O$ + 2.85 g $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$ + 9 g NaCl rozpustiť v dest. H_2O, doplniť objem na 1000 ml
- **75 mM fosfátový pufor, pH 6.8** – 10,2 g KH_2PO_4 do 1000 ml dest.vody, 13,06g K_2HPO_4 do 1000 ml dest. vody, zmiešať roztoky v pomere 1:1 a upraviť pH na 6,8
- fosfátový pufor /Tween
  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

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 75 mM fosfátového pufra, pH 6,8
- pridať 8 µl β- glukuronidázu from Escherichia coli
- hydrolýza 3 hod. pri 37 °C (alebo cez noc pri lab. teplote)
- purifikácia na kolónkach C18:
- vytemperovať vzorky a reagencie na lab. teplotu, prietok 1 kvapka/s
- premyť kolónku 3 ml 100% metanolu
- premyť kolónku 2 ml 20 mM Tris-HCl/methanol
- aplikovať vzorku

- premyť kolónku 2 ml 20 mM Tris-HCl/methanol
- premyť kolónku 3 ml 40% metanolu
- vysušiť kolónku 2 min
- eluovať vzorku 1 ml 80% metanolu pri 15 kvapiek/min
- eluát odpariť do sucha pri 60 °C a pod prúdom dusíka
- odparky skladovať v mrazničke max. 6 mesiacov
- tesne pred nanášaním na platničku odparky rozpustiť v 0,5 ml fosfátového pufra Tween
- z tohto roztoku nanášať 2x 50 µl na platničku

B) Príprava vzorky – sval

- odstrániť tuk, zomlieť vzorku na mäsovom mlynčeku, alebo pokrájať na malé kúsky
- 10 g pomletej vzorky homogenizovať s 10 ml 20 mM PBS pufra, pH 7,2
- 2 g homogenátu extrahovať s 10 ml terc. butylmetyléteru 30 min.
- centrifugovať 10 min. / 4000g / 15°C
- supernatant (éterová vrstva) preniesť do čistej skúmavky (so zábrusom)
- supernatant odpariť pri 60°C pod prúdom N_2
- odparok rozpustiť v 1 ml chloroformu
- pridať 3 ml 1 M NaOH, na vortexe miešať 30 sec.
- centrifugovať 10 min, 4000 G, 15 °C
- hornú vodnú fázu (NaOH) extrakt) preniesť do čistej skúmavky
- pridať 250 µl kys.octovej (96%), 5 ml terc. butylmetyléteru
- miešať na vortexe 30 sec.
- centrifugovať 10 min, 4000 G, 15 °C
- vzorku vymraziť pri -25 °C, 60 min
- supernatant (éterová vrstva) preniesť do čistej skúmavky a odpariť pod prúdom dusíka pri 60 °C
- odparky skladovať v mrazničke max. 6 mesiacov
- tesne pred nanášaním na platničku odparky rozpustiť v 0,5 ml fosfátového pufra Tween
- z tohto roztoku nanášať 2x 50µl na platničku

5.2. PRÍPRAVA MERANIA: ELISA - Zeranol

- platničku a všetky reagencie vytemperovať na laboratórnu teplotu, súpravu skladovať v chladničke, nesmie zamrznúť
- označiť protokol a platničku
- počas práce zabrániť vysušeniu jamôk v mikroplatničke!
- zamedziť prístupu priameho slnečného svetla počas jednotlivých inkubačných periód!
- Štandardné roztoky:
  Rozpustiť lyofilizovaný štandardný roztok v 2 ml dilučného pufra. Získame koncentráciu Zeranolu 5 ng/ml – zásobný roztok. Tento roztok sa ďalej nariedi tak, aby sme získali koncentrácie: 1,0; 0,5; 0,25; 0,125; 0,063 v ng/ml.
- Rozpustený lyofilizovaný štandardný roztok je možné skladovať v chladničke pri teplote 2 – 8 °C maximálne týždeň.
- substrátový roztok, pripravený na použitie, po vytemperovaní skontrolovať obsah, pretože pri skladovaní pri 4°C sa zráža!

- enzymatický konjugát opatrne premiešať, zriediť 4 ml dilučného pufra, uložiť do tmy až do použitia.
- protilátku zriediť 4 ml dilučného pufra
- premývací (rinsing) pufor zriediť 20 x destilovanou vodou

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.
- Pozitívnu aj negatívnu kontrolu pripraviť z interného referenčného materiálu s prídavkom štandardu o koncentrácii 0,5 µg/l; resp. 0 µg/kg rovnakým postupom ako je postup spracovania vzoriek
- na platničku naniesť 2x (A1, B1)100 µl dilučného fosfátového pufra, 2x 50µl dilučného fosfátového pufra (zero štandardu), 50 µl štandardov, 50 µl zriedenej vzorky
- 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 tme pri 37 °C
- potom 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 zeranolu vo vzorke (v µg/l, resp. µg/kg) vypočítanú z kalibračnej krivky treba násobiť zrieďovacím faktorom.
Zrieďovací faktor pre vzorky moču = **1**,
pre sval = **0,5** ak bol dodržaný pracovný postup.
Priebeh kalibračnej krivky a namerané hodnoty sú vyhodnotené softvérom Ridasoft alebo Revelation.
Meranie je platné ak A(zero štandardu) pri 450 nm > 0,6.

7. LITERATÚRA

7.1. RIDASCREEN® Zeranol – Enzyme immunoassay for the quantitative analysis of Zeranol, R-Biopharm GmbH, Germany
7.2. RIDASCREEN® Zeranol – Application note, meat, R-Biopharm GmbH, Germany
7.3. Zeranol – Enzyme immunoassay for the quantitative analysis of Zeranol, Laboratory of Hormonology, Belgium
7.4. Zeranol , Acompetitive enzyme immunoassay for screening on the presence of zeranol in biological matrices, Europroxima, Netherlands