CH 7.6. Dôkaz prítomnosti ethynylestradiolu v moči a vo svale metódou ELISA

1 URČENIE METÓDY

Je to kompetitívny imunologický test na dôkaz prítomnosti ethynylestradiolu v moči a vo svale . Je vhodný na skríningové analýzy vzoriek.

2 PRINCÍP METÓDY

Základom testu je reakcia antigén – protilátka. Jamky v ELISA súprave sú potiahnuté naviazanými protilátkami priamo oproti anti-ethynylestradiol protilátkam. K štandardom alebo roztokom vzoriek sa pridajú ethynylestradiol enzým konjugát a anti-ethynylestradiol protilátky. Voľný a enzýmovo konjugovaný ethynylestradiol konkurujú o miesta s naviazanou protilátkou (konkurenčný enzýmový imunologický test). Nenaviazaný enzýmový konjugát sa potom odstráni v premývacom kroku. Do jamiek sa pridá enzýmový substrát a chromogén a platnička sa inkubuje. Viazaný enzýmový konjugát sa zmení z bezfarebného chromogénu na modrý. Prídavok stop roztoku vedie k zmene farby z modrej na žltú. Meranie sa vykoná fotometricky pri 450 nm (voliteľná referenčná vlnová dĺžka ≥ 600 nm). Absorpcia je nepriamo úmerná koncentrácii ethynylestradiolu 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
- separačné kolonky C18 na SPE (Varian)
- mikropipety s nastaviteľným objemom jednokanálové, viackanálové
- ELISA reader - spektrofotometer (450 nm) + PC

3.2 CHEMIKÁLIE A ROZTOKY

- terc 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

- **500mM acetátový pufor, pH 4.8** – 41 g CH_3COONa rozpustiť v dest. H_2O, upraviť pH pomocou 20% CH_3COOH na 4.8, doplniť objem na 1000 ml
- **50mM acetátový pufor, pH 4.8** – 4.1 g CH_3COONa rozpustiť v dest. H_2O, upraviť pH pomocou 20% CH_3COOH na 4.8, doplniť objem na 1000 ml
- **200mM Tris-HCl, pH 8.5** – 24.2 g Tris rozpustiť v dest. H_2O, upraviť pH pomocou HCl na 8.5, doplniť objem na 1000 ml
- **20mM Tris-HCl, pH 8.5 / metanol (80/20 v/v)** – 100 ml 200mM zásobného roztoku zmiešať so 700 ml dest. H_2O a 200 ml 100% metanolu
- **20mM PBS pufor, pH 7.2** – 0.55 g $NaH_2PO_4 \times H_2O$ + 2.85 g $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$ + 9.0 g NaCl rozpustiť v dest. H_2O, doplniť objem na 1000 ml
- **67mM 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 dest. H_2O, doplniť objem na 1000 ml

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

A) moč
- zriediť 0.5 ml moču 3 ml 50mM acetátového pufru, pH 4.8
- pridať 8 µl glukuronidázy/arylsulfatázy Helix pomatia
- hydrolýza 3 hod. pri 37°C (alebo cez noc pri lab. teplote)
- purifikácia na kolónkach C18:

- vytemperovať vzorky a reagencie na laboratórnu teplotu,
- premyť kolónku 3 ml 100% metanolu, prietok 1 kvapka/s
- premyť kolónku 2 ml 20mM Tris-HCl, pH 8.5 / metanol (80/20 v/v)
- aplikovať vzorku
- premyť kolónku 2 ml 20mM Tris-HCl, pH 8.5 / metanol (80/20 v/v)
- premyť kolónku 3 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!)

B) sval

- odstrániť tuk, zomlieť vzorku na mäsovom mlynčeku, alebo pokrájať na malé kúsky
- 10 g pomletej vzorky homogenizovať s 10 ml 67mM PBS pufru, pH 7.2
- 2 g homogenátu extrahovať s 5 ml terc. butylmetyléteru 30 min.

- centrifugovať 10 min. / 3000g / 10-15°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 20mM PBS pufra, pH 7.2
- purifikovať na kolónke C18:
- vytemperovať vzorky a reagencie na lab. teplotu, prietok 1 kvapka/s
- premyť kolónku 3 ml 100% metanolu
- premyť kolónku 2 ml 20mM PBS pufru, pH 7.2
- aplikovať vzorku
- premyť kolónku 2 ml 40% metanolu
- vysušiť kolónku 3 min
- eluovať vzorku 1 ml 80% metanolu
- zriediť eluát 1:1 dest. H_2O (tesne pred nanášaním na platničku!)

5.2 PRÍPRAVA MERANIA ELISA – Ethynylestradiol

- 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)
- protilátku opatrne premiešať, zriediť 1:11 (1+10)

5.3. POSTUP ELISA

- Pri každom meraní nanášať na platničku 6 štandardov zo súpravy, 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/l(blank) rovnakým postupom ako je postup spracovania vzoriek.
- do každej jamky pridať 20 µl štandardu, pripravenej vzorky (vzorky aj štandardy nanášame duplicitne, paralelky), 20 µl pozitívnej a negatívnej kontroly
- do každej jamky pridať 50 µl zriedeného enzýmového konjugátu
- do každej jamky pridať 50 µl zriedenej protilátky
- dobre premiešať, inkubovať 2 hod. pri lab. teplote v tme
- odsať na papierovej vate
- premyť 3 × 250 µl dest. H_2O
- 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

Priebeh kalibračnej krivky je vyhodnotený so softvérom Ridasoft. Koncentráciu ethynylestradiolu vo vzorke (v µg/l, resp. µg/kg) vypočítanú z kalibračnej krivky treba násobiť zrieďovacím faktorom. Zrieďovací faktor pre vzorky moču = **4**, pre sval = **2,** ak bol dodržaný pracovný postup.

7. LITERATÚRA

7.1 RIDASCREEN® Ethynylestradiol – Enzyme immunoassay for the quantitative analysis of ethinylestradiol, R-Biopharm GmbH, Germany