CH 7.4.

Dôkaz prítomnosti trenbolonu v moči a vo svale metódou ELISA

1. URČENIE METÓDY

Je to nepriama kompetitívna enzýmová imunoanalytická metóda na dôkaz prítomnosti trenbolonu 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 antigénmi orientovanými proti anti-trenbolon protilátkam. K štandardom alebo vzorkám sa pridá enzýmový konjugát a anti-trenbolon protilátky. Voľný a enzýmovo konjugovaný trenbolon súťažia o naviazanie na väzbové miesta protilátok. Súčasne anti-trenbolon protilátky sú tiež viazané imobilizovanými zachytenými protilátkami. Po inkubácii 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. Naviazaný enzýmový konjugát zmení bezfarebný chromogén na modrý produkt. Prídavok stop roztoku vedie k zmene farby z modrej na žltú. Zmeria sa absorbancia pri 450 nm. Absorpcia je nepriamo úmerná koncentrácii trenbolonu v štandarde alebo vo vzorke.

3. POMÔCKY

3.1. PRÍSTROJE A ZARIADENIA

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

3.2. CHEMIKÁLIE

- 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
- **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

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 50mM acetátového pufra, 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 lab. teplotu, prietok 1 kvapka/s
- premyť kolónku 3 ml 100% metanolu
- premyť kolónku 2 ml 20mM PBS
- aplikovať vzorku
- premyť kolónku 2 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!)
- eluát skladovať v mrazničke max. 6 mesiacov

B) Príprava vzorky – sval

- odstrániť tuk, zomlieť vzorku na mäsovom mlynčeku, alebo pokrájať na malé kúsky
- 10 g pomletej vzorky homogenizovať s 10 ml 67mM PBS pufra 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)
- extrakciu zopakovať s ďalšími 5 ml terc. butylmetyléteru
- spojené supernatanty odpariť pri 60°C pod prúdom N_2
- odparok rozpustiť v 1 ml 80% metanolu
- pridať 2 ml 20mM PBS pufru, 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!)
- eluát skladovať v mrazničke max. 6 mesiacov

5.2. PRÍPRAVA MERANIA: ELISA - Trenbolon

- platničku a všetky reagencie vytemperovať na lab. 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!
- enzymatický konjugát opatrne premiešať, zriediť 1:11 (1+10) dilučným pufrom zo súpravy
- protilátku opatrne premiešať, zriediť 1:11 (1+10) dilučným pufrom zo súpravy

5.3. POSTUP ELISA

- Pri každom meraní nanášať na platničku 6 štandardov zo súpravy (koncentrácie: 0 µg/l; 0,025 µg/l; 0,05 µg/l; 0,10 µg/l; 0,20 µg/l; 0,40 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/l (blank) rovnakým postupom ako je postup spracovania vzoriek
- do každej jamky pridať 20 µl štandardu, alebo pripravenej vzorky (vzorky aj štandardy nanášať 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 priložený ku každej súprave, ako aj ku každému výsledku merania. Koncentráciu trenbolonu 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.

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

7. LITERATÚRA

7.1. RIDASCREEN® Trenbolon – Enzyme immunoassay for the quantitative analysis of Trenbolone, R-Biopharm GmbH, Germany
7.2. RIDASCREEN® Testosteron, 17 β-Ostradiol, Methyltestosteron, 19-Nortestosteron, Trenbolon (Supplement), R-Biopharm GmbH, Germany