CH 7.8. Dôkaz prítomnosti stanozololu v moči metódou ELISA

1 URČENIE METÓDY

Je to kompetitívny imunologický test na dôkaz prítomnosti stanozololu v moči. Je vhodný na skríningové analýzy vzoriek.

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 štandardy stanozololu, vzorky a k nim stanozolol protilátka a enzýmovo konjugovaný stanozolol , za čím nasleduje inkubačný krok. Nadbytok nenaviazaného konjugátu po inkubácii sa odstráni premytím. Pridá sa enzýmový substrát a chromogén, s ktorým konjugovaný enzým zreaguje na farebný derivát substrátu. Prídavkom STOP činidla sa modré sfarbenie zmení na žlté. Intenzita sfarbenia je nepriamo úmerná hladine naviazanej špecifickej protilátky a dá sa kvantifikovať fotometricky pri 450nm.

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

- dest.voda
- ostatné potrebné roztoky sa dodávajú v ELISA súprave

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) priama metóda

- vzorku zriediť 5 krát: 200 µl moču + 800 µl dilučného pufra zo súpravy (prípadne sa môže použiť PBS , ten istý sa potom musí použiť na prípravu štandardných roztokov)
- premiešať a skontrolovať pH hodnotu (pH 7 ± 0,5)
- odstrediť 10 min (2000 g) pri lab. teplote a zo supernatantu použiť 50µl na test

Pozn.: Špeciálne pre tmavé a/alebo špinavé vzorky sa použije extrakčná metóda

b) extrakčná metóda

- preniesť 0,5 ml moču do centrifugačnej skúmavky
- pridať pár kvapiek 1M kyseliny octovej na úpravu pH na hodnotu 4,8
- premiešať a pridať 13 µl enzýmu Helix pomatia a inkubovať cez noc pri 37 °C, alebo 2 hodiny pri 55 °C
- po inkubácii ochladiť na laboratórnu teplotu
- pridať 50 µl 5M hydroxidu sodného a 6 ml terc-butyl-metyléteru, premiešať 2 minúty na vortexe a centrifugovať 10 minút pri 3000g
- nabrať z hornej vrstvy (terc-butyl-metyléter) 3 ml a v skúmavke odpariť pod prúdom dusíka pri 40 °C do sucha
- odparok rozpustiť v 500µl dilučného pufra (zodpovedá 0,25 ml moču/500 µl pufra
- použiť 50 µl na test

5.2. PRÍPRAVA MERANIA: ELISA - Stanozolol

- 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!
- Dilučný pufor: zriediť 10 krát destilovanou vodou
- Rinsing – premývací pufor: zriediť 20 krát destilovanou vodou
- Enzýmový konjugát: zriediť 100 krát dilučným pufrom
- Protilátka: obsah vialky s lyofilizovanou protilátkou zriediť so 4 ml dilučného pufra
- Substrát/chromogén: je pripravený na použitie, ale zráža sa pri 4 °C. Treba sa uistiť, že roztok dosiahol laboratórnu teplotu (temperovať v tme!) a premiešať obsah pred pipetovaním na platničku
- Štandardné roztoky : zásobný štandardný roztok Stanozololu o koncentrácii 1µg/ml sa dodáva so súpravou, tento sa nariedi ďalej tak, aby sa získali koncentrácie : 0,05 µg/l, 0,10 µg/l, 0,2 µg/l, 0,5 µg/l, 1 µg/l a 2 µg/l.

5.3. POSTUP ELISA

- nanášať na platničku 2x 100 µl dilučného pufra A1, B1(pre kontrolu nešpecifickej väzby NSB)
- naniesť na platničku 2x 50 µl dilučného pufra (zero štandard)
- ďalej nanášať na platničku 50 µl duplicitne 6 štandardov (koncentrácie: 0,05 µg/l; 0,10 µg/l; 0,2 µg/l; 0,5 µg/l; 1 µg/l a 2 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 a spracovať rovnakým postupom ako je postup spracovania vzoriek
- do každej jamky okrem A1, B1 (NSB) pridať 25 µl zriedeného enzýmového konjugátu
- do každej jamky okrem NSB pridať 25 µl zriedenej protilátky
- dobre premiešať asi 1 minútu
- inkubovať platničku 30 minút pri laboratórnej teplote
- vyliať obsah jamiek a premyť 3 × 300 µl rinsing-premývacím pufrom
- vždy po vyliatí obsahu odsať na papierovej vate
- do každej jamky pridať 100 µl substrátového roztoku
- dobre premiešať, inkubovať 15 min pri laboratórnej teplote v tme
- pridať 100 µl STOP činidla, premiešať, hneď merať absorbanciu pri 450 nm

6. VYHODNOTENIE NAMERANÝCH ÚDAJOV

Priebeh kalibračnej krivky sa vyhodnotí so softvérom REVEL. Koncentráciu stanozololu vo vzorke (v µg/l) vypočítanú z kalibračnej krivky treba násobiť zrieďovacím faktorom.
Zrieďovací faktor pre vzorky moču = 5, ak sa vzorky spracovali priamou metódou.
Pri použití extrakčnej metódy sa počíta so zrieďovacím faktorom = 2.
Priebeh kalibračnej krivky a ostatné namerané hodnoty vyhodnotiť softvérom REVEL, prípadne Ridasoft.

7. LITERATÚRA

7.1. Stanozolol . A competitive enzyme immunoassay for quantitative analysis of Stanozolol. EuroProxima, The Netherlands