CH 7.7. Dôkaz prítomnosti methyltestosteronu v moči a vo svale metódou ELISA

1. URČENIE METÓDY

Je to nepriama kompetitívna enzýmová imunoanalytická metóda na dôkaz prítomnosti methyltestosteronu 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 orientovanými proti IgG. Do potiahnutých jamiek sa pridajú štandardy nortestosterónu, vzorky a anti-methyltestosterone, methyltestosteron enzýmový konjugát, za čím nasleduje inkubačný krok. Nenaviazaný konjugát sa po inkubácii odstráni premytím. Potom sa pridá ešte substrát a inkubuje sa 30 minút v tme pri laboratórnej teplote. Konjugovaný enzým zreaguje na farebný derivát substrátu. Intenzita sfarbenia je nepriamo úmerná hladine naviazanej špecifickej protilátky a dá sa kvantifikovať fotometricky pri 450nm.

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
- mikropipety s nastaviteľným objemom jednokanálové, viackanálové
- ELISA reader spektrofotometer (450 nm) + PC
- Chladnička (4± 2 °C)

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.
- 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 pufru, pH 4.8
- pridať 8 µl glukuronidázy/arylsulfatázy Helix pomatia
- hydrolýza 3 hod. pri 55°C (alebo cez noc pri lab. teplote)
- purifikácia na kolónkach C18
- vytemperovať vzorky a reagencie na lab. teplotu, prietok 1 kvapka/s
- premyť kolónku 2 ml 100% metanolu
- premyť kolónku 2 ml 50mM acetátovým pufrom pH 4,8
- aplikovať vzorku
- premyť kolónku 2 ml 50mM acetátovým pufrom pH 4,8
- premyť kolónku 3 ml 40% metanolu
- vysušiť kolónku
- eluovať vzorku 1 ml 80% metanolu
- eluát odprariť pri 60 °C pod prúdom N_2
- odparok zriediť 100µl metanolom a 900 µl dilučným pufrom zo súpravy

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)
- supernatant 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 2 min
- eluovať vzorku 1 ml 80% metanolu
- eluát odpariť pri 60°C pod prúdom N_2
- odparok zriediť s 200 µl metanolom a 1800 µl dilučným pufrom zo súpravy

5.2. PRÍPRAVA MERANIA: ELISA – Methyltestosterone

- platničku a všetky reagencie vytemperovať na lab. teplotu
- označiť protokol a platničku
- počas práce zabrániť vysušeniu jamôk v mikroplatničke!
- zamedziť prístupu priameho slnečného svetla počas jednotlivých inkubačných periód!
- Dilučný pufor: zriediť 10x destilovanou vodou
- Rinsing pufor: zriediť 10x destilovanou vodou
- Enzýmový konjugát: zriediť 100x dilučným pufrom
- Protilátka: obsah vialky zriediť so 6 ml dilučného pufra

5.3. POSTUP ELISA

- Pri každom meraní nanášať na platničku 6 štandardov zo súpravy (koncentrácie: 0µg.l^{-1}; 0,1 µg.l^{-1}; 0,2 µg.l^{-1}; 0,5 µg.l^{-1}; 1,0 µg.l^{-1}; 2,0 µg.l^{-1}), dilučný pufor (NSB), pripravené vzorky a pozitívnu a negatívnu kontrolu.
  Pozitívnu aj negatívnu kontrolu pripraviť z interného referenčného materiálu s prídavkom štandardu o koncentrácii 0,5 µg.kg^{-1},resp.0µg.kg^{-1}(blank)rovnakým postupom ako je postup spracovania vzoriek.
- do každej jamky pridať 150 µl dilučného pufra, 50 µl štandardu, pripravenej vzorky, pozitívnu a negatívnu kontrolu (vzorky aj štandardy nanášame duplicitne - paralelky)
- do každej jamky pridať 100 µl zriedeného enzýmového konjugátu okrem NSB
- do každej jamky pridať 100 µl zriedenej protilátky okrem NSB
- dobre premiešať, inkubovať 2 hod. pri 4 °C (v chladničke)
- odsať na papierovej vate
- premyť 3 × 250 µl rinsing pufrom
- odsať na papierovej vate
- do každej jamky pridať 150 µl peroxide/TMB
- dobre premiešať, inkubovať 30 min pri lab. teplote v tme
- pridať 50 µl STOP činidla, premiešať, merať absorbanciu pri 450 nm (odčítať do 30 min.)

6. VYHODNOTENIE NAMERANÝCH ÚDAJOV

Priebeh kalibračnej krivky vyhodnotí software REVEL. Koncentráciu methyltestosteronu vo vzorke (v µg/l, resp. µg/kg) vypočítanú z kalibračnej krivky treba násobiť zrieďovacím faktorom. Zrieďovací faktor pre vzorky moču = **2**, pre sval = **2,** ak bol dodržaný pracovný postup.

7. LITERATÚRA

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

7.2. Laboratory of Hormonology Methyltestosterone – Enzyme immunoassay for the quantitative analysis of Methyltestosterone Laboratory of Hormonology, Belgium