CH 7.9. Dôkaz prítomnosti Dexametazonu a kortikosteroidov metódou ELISA

1. URČENIE METÓDY

Je to nepriama kompetitívna enzýmová imunoanalytická metóda na dôkaz prítomnosti kortikosteroidov ako dexamethasone, betamethasone, flumethasone, triamcinolone a prednisolone v mlieku, moči, pečeni, vo svale a v krmivách 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 na králičí IgG. Do potiahnutých jamiek sa pridajú špecifické protilátky (králičí anti-dexamethasone), enzýmovo značený dexamethasone (enzýmový konjugát) a štandardy dexamethasonu alebo vzorky, za čím nasleduje inkubačný krok. Špecifické protilátky sa naviažu na imobilné králičie antigény a v tom istom čase dexamethasone (prítomný v štandarde alebo vo vzorke) a enzýmovo značený dexamethasone si konkurujú navzájom v obsadzovaní špecifických miest (kompetitívna enzýmová imunoanalýza). Po inkubácii a odstránení nadbytku konjugátu premytím sa pridá ešte chromogén substrát (tetramethylbenzidín – TMB), s ktorým konjugovaný enzým zreaguje na farebný derivát substrátu. Reakcia sa stopne pridaním kyseliny sírovej, ktorá spôsobí zmenu farby z modrej na žltú. Intenzita sfarbenia je nepriamo úmerná hladine naviazanej špecifickej protilátky a dá sa kvantifikovať fotometricky pri 450 nm.

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
- SPE kolonky C18
- mikropipety s nastaviteľným objemom jednokanálové, viackanálové
- ELISA reader spektrofotometer (450 nm) + PC
- váhy

3.2. CHEMIKÁLIE A ROZTOKY

- terciálny 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.
- hydroxid sodný (NaOH) p.a.
- etylacetát

3.3. PRÍPRAVA ROZTOKOV

- **0,2M acetátový pufor, pH 4.8** – 16.4 g CH_3COONa rozpustiť v destilovanej H_2O, upraviť pH pomocou 20% CH_3COOH na 4,8 a doplniť objem na 1000 ml
- **0,5 M NaOH –** 20 g NaOH sa rozpustiť v dest. H_2O a doplniť na objem 1000 ml
- **1 M kyselina octová** – 63 ml kyseliny octovej zriediť v destilovanej vode a doplniť na objem 1000 ml.
- **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. Pri práci je potrebné dodržiavať zásady pre bezpečnú prácu v chemickom laboratóriu v zmysle STN 018003.

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

Pozitívnu aj negatívnu kontrolu pripraviť z interného referenčného materiálu s prídavkom štandardu tak, aby sa získala výsledná koncentrácia 0,5 µg/l (µg/kg); resp. 0 µg/l (µg/kg). Kontroly spracovať rovnakým postupom ako je postup spracovania vzoriek.

A) Príprava vzorky – moč

- napipetovať 1 ml moču do čistej skúmavky
- pridať 1 ml 0,2 M acetátového pufra (pH 4,8)
- skontrolovať pH a ak je potrebné , upraviť na hodnotu 4,8 pár kvapkami 1M kyseliny octovej
- pridať 10µl 10x zriedenej (s destilovanou vodou) glukuronidázy Helix pomatia
- inkubovať cez noc pri 37 °C alebo počas 2 hodín pri teplote 55°C
- nechať vychladnúť na laboratórnu teplotu
- upraviť pH na 7,4 ± 0,4 prídavkom 100 µl 0,5M NaOH
- pridať 4 ml etylacetátu
- premiešať 15 minút pri lab. teplote prevracaním dnom nahor a späť
- centrifugovať 10 minút pri 2000xg a 4 °C
- odpipetovať 2 ml supernatantu do čistej sklenej skúmavky a odpariť do sucha pod prúdom dusíka a pri teplote 50 °C
- odparok rozpustiť v 0,5 ml fosfátového pufra Tween
- na ELISU nanášať 50 µl

B) Príprava vzorky sval (pečeň):
- pripraviť približne 10 až 50g zhomogenizovanej vzorky tkaniva
- navážiť do čistej centrifugačnej skúmavky 1g posekanej vzorky, pridať 3 ml destilovanej vody
- premiešať na vortexe 1 minútu
- pridať 4 ml etylacetátu
- pretrepať vzorku 30 minút prevracaním dnom nahor a späť
- centrifugovať 10minút pri 2000xg a pri teplote 4 °C
- odpipetovať 1 ml supernatantu do sklenej skúmavky
- odpariť do sucha pod prúdom dusíka pri teplote 50 °C
- odparok rozpustiť v 0,5ml fosfátového Tween pufra
- na ELISU použiť 50 µl

Poznámka:
Ak po odparení vznikne mastný odparok, treba ho rozpustiť v 1 ml hexánu, pridať 1 ml fosfátového Tween pufra, premiešať na vortexe 1 minútu a centrifugovať10 minút pri 2000xg.

C) Príprava vzoriek – krmivo:
- pomlieť 10 až 100g vzorky krmiva
- homogenizovať 1 g pomletej vzorky so 4 ml etylacetátu
- premiešať 30 minút prevracaním dnom nahor a späť
- centrifugovať 10 minút pri 2000xg a pri teplote 4 °C
- odpipetovať 1 ml supernatantu do čistej sklenej skúmavky a odpariť pod prúdom dusíka do sucha pri teplote 50 °C
- odparok rozpustiť v 0,25 ml fosfátového Tween pufra
- na ELISU použiť 50 µl

D) Príprava vzoriek – odtučnené mlieko:
- vzorky mlieka sa analyzujú priamo po odtučnení (centrifugovať 10 minút pri 2000xg a pri 4 °C
- 50 µl odtučneného mlieka sa pipetuje na platničku

5.2. PRÍPRAVA MERANIA: ELISA - Corticosteroid

- súpravu skladovať v chladničke pri teplote 2 – 8°C, pred analýzou 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!
- ktorúkoľvek reagenciu, ktorá sa nebude používať, treba ihneď vrátiť do chladničky!
- Zrieďovací (dilution) pufor – dodáva sa hotový, pripravený na použitie
- Premývací (rinsing) pufor - dodáva sa 20x zakoncentrovaný. Nariediť čerstvo pred použitím.
- Roztok substrát chromogén (12 ml) - dodáva sa hotový, pripravený na použitie, zráža sa pri 4 °C. Preto je potrebné dbať na to, aby sa vytemperoval na laboratórnu teplotu a dôkladne ho premiešať pred nanášaním na platničku.
- Roztok konjugátu (DEX-HRPO) – lyofilizovaný konjugát rekonštituovať pridaním 4 ml dilučného pufra, dôkladne premiešať a ponechať v tme až do použitia.
- Roztok protilátky – lyofilizované protilátky rekonštituovať pridaním 4 ml dilučného pufra, dôkladne premiešať a ponechať v tme až do použitia.

5.3. POSTUP ELISA

- na platničku naniesť 2x (A1, B1) **100 µl** zero štandardu
- duplicitne 50 µl zero štandardu
- naniesť duplicitne 50 µl z každého štandardného roztoku s koncentráciami: 0,125 µg/l; 0,25 µg/l; 0,5 µg/l; 1,0 µg/l; 2,0 µg/l ; 4,0 µg/)
- naniesť duplicitne 50 µl z pozitívnej aj negatívnej kontroly a 2x 50 µl z každej pripravenej vzorky
- do každej jamky okrem A1, B1 pridať 25 µl zriedeného konjugátu (DEX-HRPO)
- do každej jamky okrem A1, B1 napipetovať 25 µl nariedeného roztoku protilátky
- pevne uchopiť platničku a opatrne krúživým pohybom roztoky v jamkách premiešať
- platničku uložiť do tmy a inkubovať 1 hodinu pri laboratórnej teplote (20-25 °C)
- vyliať obsah platničky , odsať na papierovej vate
- premyť 3 × 300 µl premývacieho (rinsing) pufra, po vyliatí vždy odsať na papierovej vate
- napipetovať 100 µl substrátového roztoku do každej jamky
- inkubovať 30 minút pri laboratórnej teplote v tme
- pridať 100 µl stop činidla do každej jamky a premiešať
- skontrolovať obsah jamiek a odstrániť bubliny, odčítať pri 450nm

6. VYHODNOTENIE NAMERANÝCH ÚDAJOV

Priebeh kalibračnej krivky by mal byť prakticky lineárny v rozsahu (0,125 – 4,0) µg/l a je priložený ku každej súprave. Tento dokument sa priloží ku každej sérii meraní.
Koncentráciu Dexametazonu (kortikosteroidov) vo vzorke (v µg/l, resp. µg/kg) vypočítanú z kalibračnej krivky treba násobiť zrieďovacím faktorom:

Zrieďovací faktor pre vzorky moču = **1**,
pre sval = **2**

pre sval s následnou extrakciou tuku = **4**
pre krmivo = **1**
pre mlieko = **1**

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

7. LITERATÚRA

7.1. Corticosteroid EIA A microtitre plate based enzyme immunoassay for the screening of milk, urine, tissue and feed samples on the presence of Corticosteroids, Europroxima, Netherlands