

1) Název

SOP-CCT-CYANOTOX-ELISA

Stanovení microcystinů s využitím ELISA

2) Autor

Lucie Bláhová, Luděk Bláha a kol. (Centrum pro cyanobakterie a jejich toxiny, Botanický ústav AVČR a VC RECETOX PřF MU, Brno)

3) Určení a cíl

Imunochemické stanovení microcystinů ve vzorku (voda)

4) Princip

Stanovení je založeno na kompetici microcystinů (rozpuštěné MC ve vzorku) s připraveným konjugátem (= MC-tracer-peroxidáza, MC-HRP) o vazná místa na myší monoklonální protilátce proti microcystinu-LR (MAb) vázané na mikrodesece pomocí další protilátky (IgG, anti-myší anti-Fc IgG). Jde o přímou kompetitivní ELISA: slepý vzorek (destilovaná voda) bez přítomnosti MC - se na MAb váže jen značený microcystin (MC-HRP) a následně je vysoká aktivita enzymu HRP (peroxidáza) kvantifikována vznikem barevného produktu; v přítomnosti MC ve vzorku dochází ke kompetici o vazná místa na protilátku (MAb) a MC-HRP se váže na méně vazebných míst protilátky. Díky nižší koncentraci navázaného MC-HRP vzniká méně barevného produktu enzymatickou reakcí HRP v přítomnosti volného MC.

5) Terminologie

6) Rušivé vlivy a Omezení metody

Celý postup je třeba realizovat v definovaných časových intervalech a deska v průběhu měření nesmí vyschnout (např. nechat stát na stole prázdnou desku apod.).

7) Bezpečnost při práci a toxikologické údaje

Microcystiny jsou toxické látky! Microcystiny jsou podle vyhlášky 474/2002 Sb. Příl. č. 1 považovány za VYSOCE RIZIKOVÉ TOXINY. Jakékoli nakládání s nimi je možné pouze na základě oprávnění vydaného Státním úřadem pro jadernou bezpečnost. Veškerá manipulace s VRT musí být v souladu s předepsanými bezpečnostními opatřeními a podléhá přísné EVIDENCI a kontrole!

Kyselina sírová – silná žíravina!

Při práci používat ochranné rukavice.

8) Odpady a likvidace

Promývací roztoky a odpad vylévat do výlevky a spláchnout vodou. Použité destičky, špičky, zkumavky od vzorků, eppendorfky apod. likvidovat jako běžný pevný odpad.

9) Normativní odkazy

10) Chemikálie a spotřební materiál

- ❖ **PUFRY** (připravené podle SOP-CCT-CYANOTOX-ELISA-003) a uložené při **laboratorní teplotě** (kontejner „ELISA“, Laboratoř cyanotoxinů):

Uhličitanový pufr, (40 mM, pH 9.6)

Pufr používaný k ředění a krytí desky první protilátkou (IgG).

PBS (80 mM !!! koncentrovaný, pH 7.4, NaCl 8,76 g/l)

Pufr používaný ke krytí desky druhou protilátkou - monoklonální anti-MC (MAb).

PBS (7 mM standardní, pH 7.4, NaCl 150 mM)

Puftr na promývání mezi IgG a MAb.

PBS + Tween20 (7 mM standardní, pH 7.4, NaCl 150 mM ,+ 0,05% v/v Tween20)

Puftr na promývání desky po navázání protilátek (po MAb).

TRIS (0.1 M, pH 7.4, NaCl 8.76 g/l)

Puftr na ředění konjugátu.

H₂SO₄ 5% v/v.

Kyselina - zastavení enzymatické reakce na konci.

- ❖ **PUFR** (připravený podle SOP-CCT-CYANOTOX-ELISA-003) a uložený v **lednici +4°C** (krabice „ELISA“, Lednice - Laboratoř cyanotoxinů):

TRIS koncentrovaný (1M, pH 7.4, NaCl 87.6 g/l, 1% BSA, 1% EDTA)

Blokovací puftr přidávaný těsně před vzorkem - blokování nespecifických vazeb.

- ❖ **CHEMIKÁLIE** uložené v mrazáku **při -18°C** (krabice „ELISA“, Mrazák se zámekem - Laboratoř cyanotoxinů)

MAb

(10x zředěná rozplněná v eppendorfcce + neředěný zásobní roztok v originální lahvičce) - komerční protilátka (*monoklonální - v myši vyrobená - protilátka proti microcystinu-LR, ALEXIS*)

Konjugát MC-HRP

stabilizovaný 1%BSA, rozdělený do několika šroubovacích plastických zkumavek a uchovaný při -18°C.

Příprava konjugátu (MC-HRP) - Chemická syntéza komerční peroxidázy (HRP = horse radish peroxidase) s čistým microcystinem-LR přes můstek vytvořený Traut's reagent a následné přečištění gelovou chromatografií. Postup (vyrobena v laboratořích RECETOX- SOP-CCT-CYANOTOX-ELISA-004)

Zásobní roztok MC-LR pro kalibraci

Přibližná koncentrace 2 ug/mL MC-LR ve vodném roztoku - přesná koncentrace ověřená pomocí metody HPLC-DAD uvedená na vialce i v protokolu u vialky se standardem.

- ❖ **CHEMIKÁLIE** uložené v lednici **při 4°C** (krabice „ELISA“, Lednice - Laboratoř cyanotoxinů)

TMB

chromogenní substrát pro peroxidázu (HRP) - „tetramethylbenzidine“ - komerční: TESTLINE (zásobní roztok je ve stříbrné 1,5L velké lahvi - z něj je odlito do hnědé lahvičky od firmy Sigma)

IgG

komerční protilátka, v skleněné původní nádobce (*koží polyklonální anti-myši anti-FcIgG protilátka třídy IgG, MP BIOMEDICALS*)

- ❖ **DALŠÍ POTŘEBY** - Laboratoř cyanotoxinů

Desky NUNC - !!! nutno použít tyto "high-binding" mikrotitrační 96-ti jamkové desky, kontejner „ELISA“, Laboratoř cyanotoxinů. (*Jamky, které nebudou využity při aktuálně prováděném stanovení překrýt parafilmem. Po ukončení testu mikrodestičku uschovat - nepoužité jamky mohou být využity při dalších stanoveních.*)

Obyčejné desky - pomocné pro předpřípravu vzorku a standardu před analýzou)

Pipetovací vaničky - kontejner „ELISA“, Laboratoř cyanotoxinů - každá vanička je popsána a je určena pouze pro jeden druh roztoku !!!

Vhodné špičky pro multikanálové pipety

Skleněné pipety (5ml, 25ml)

Skleněné vialky pro přípravu kalibrační řady

Eppendorfovy zkumavky

11) Vzorky

- připravené podle SOP-CCT-CYANOTOX-MC-001-003, resp. **005, 008**

12) Přístroje

- třepačka LT-1
- vortex
- (*promývačka*)
- multikanálové pipety (8,12-kanálů) na objem 15ul-300ul, 10-200ul
- pipety do 1-10 μL, do 10-100 μL, do 100-1000 μL
- dávkovací pipeta (50-1000uL)
- mikrodestičkový spektrofotometr TECAN – Genios
- centrifuga

13) Kalibrace před zkouškou

14) Vlastní postup

Den 1

Krytí desek IgG:

IgG ve skleněné původní lahvičce (+4°C) důkladně promíchat nejméně 30s (vortexovat) !!! Dbát na to, aby se obsah skleničky nedostal do víčka odkud by se později špatně dostával.

Potřebné množství IgG ředit **2000x** v uhličitánovém pufru (tj. 1 díl rozmražen. IgG / 1999 dílům pufru). Důkladně promíchat - vortexovat !!!

Dávkovat po 250 μL/jamku.

(Celkový potřebný objem spočítat předem - např. na desku = 96 jamek x 250 μL = 24 mL + rezerva 1 mL => 12.5 μL IgG: 25 mL uhličit. pufru).

Překrýt folií - parafilmem (případně i víčkem) a nechat přes noc inkubovat na třepačce při mírném míchání v teplotě laboratoře.

Den 2

a) Vylít obsah jamek do odpadu, důkladně vše vyklepnout

b) Promývání PBS (zopakovat 5x)

- do každé jamky 250 μL PBS (standardní)
- promíchat, vylít do odpadu, vyklepnout, (případně použít promývačku)

c) Krytí desek MAb:

Zamraženou 10x zředěnou MAb(1dílní MAb:9dílní PBS:glycerol) v Eppendorfově zkumavce (-18°C) rozmrazit a důkladně promíchat (vortexovat) !!!

Připravit potřebné množství MAb **3000x** zředěné tzn. 10x zředěnou zásobní MAb zředíme ještě **300x** v koncentrovaném 80 mM PBS (tj. 1dílní zamražená 10x ředěná MAb z eppendorfky / 299dílní pufru). Důkladně promíchat - vortexovat !!!.

Dávkovat po 250 μL/jamku.

(Celkový potřebný objem spočítat předem - např. na desku = 96 jamek x 250 μ L = 24 mL + rezerva 0.5 mL => 84 μ L MAb: 25 mL 80 mM PBS).

Dávkovat 250 μ L/jamku.

Zbytky rozmražené MAb uložit do mrazáku a co nejdříve zpracovat!

d) Mikrodestičku překrýt folií - (případně víčkem a alobalem) a na třepačce nechat 60 minut mírně míchat. (pozn. délka inkubace je závislá na TMB, které bude použito ke vzniku barevné reakce – TMB od firmy TESTLINE – 60min; od SIGMY – 80min), délku inkubace při použití TMB od jiného výrobce je lepší předem optimalizovat.

e) Vylít obsah jamek do odpadu, důkladně vše vyklepnout

f) Promývání PBS + TWEEN 0.05% (zopakovat 5x)

- do každé jamky 250 μ L PBS+TWEEN

- promíchat, vylít do odpadu, vyklepnout, případně použít promývačku

g) Dávkování blokačního roztoku

Do každé jamky dávkovat 20 μ L 1M TRIS+BSA/EDTA multikanálovou pipetou (koncentrovaný TRIS - blokační roztok, uložený v lednici, předem vytemperovat na laboratorní teplotu) .

h) Dávkování vzorků

Dopředu mít připravené kalibrační roztoky a blank = destilovaná H₂O (koncentrace microcystinu-LR 0.125, 0.5 a 2 μ g/L je vhodné připravit ředěním z koncentrovaného roztoku MC-LR 2 μ g/mL v den analýzy, je třeba dbát na dobré promíchání roztoků - vortexování, zásobní roztok MC-LR 2 μ g/mL uchovávat v mrazáku ve skleněné nádobce).

Dopředu mít připravené vzorky (SOP-CCT-CYANOTOX-MC-001-002- 008), před analýzou vzorků volné vody nutno zcentrifugovat 15000ot./min 10min., aby se odstranila případná biomasa a nečistoty, zlepši se tím reprodukovatelnost výsledků.

*Ředění vzorku je nutné zejm. u vzorků, ve kterých lze očekávat koncentrace vyšší než maximální koncentrace v kalibraci (tj. > 2 μ g/L). Po ředění **5-10x** by se koncentrace vzorku měla dostat do kalibračního rozsahu metody.*

IHNED po dávkování blokačního roztoku přidávat vzorky přenesením 200 μ L z pomocné desky multikanálovou pipetou, do které byly vzorky a kalibrační roztoky (MC-LR 0.125 / 0.5 / 2 μ g/L) a blank (destilovaná H₂O) předem napipetovány v triplicátech a s rezervou 200+30 μ L v analyzovaném pořadí. Pozor na výměnu špiček při přenášení různých vzorků.

Promíchat na desce stolu kruhovým pohybem a inkubovat 40 minut na kývačce s nejnižšími otáčkami, opět zakryté folií, víčkem a alobalem.

i) Dávkování konjugátu MC-HRP.

Zásobní roztok MC-HRP je rozplněn a uložen při teplotě -18°C (mrazák „A“, Laboratoř cyanotoxinů). Před použitím rozmrazit a důkladně promíchat (vortexovat, min. 30s) !!! Stále uchovávat ve tmě (zakryté alobalem).

Připravit potřebné množství konjugátu MC-HRP 300x ředěného v 0.1M TRIS pufru (ředění 300x, tj. 1:299 v pufru 0.1 M TRIS).

(Celkový potřebný objem spočítat předem - např. na desku = 96 jamek x 50 μ L = 4.8 mL + rezerva 600 μ L => 18 μ L MC-HRP: 5.4 mL 0.1M TRIS).

Dávkovat multikanálovou pipetou do každé jamky po 50 μ L konjugátu.

Promíchat na desce stolu kruhovým pohybem a inkubovat 15 minut (maximálně 15 minut !!!) na třepačce při nejnižší frekvenci třepání zakryté víčkem a alobalem před světlem!!!

j) Obsah jamek odsát multikanálovou pipetou, nevyklepávat, zmenší se riziko kontaminace sousedních jamek.

k) Promývání PBS + TWEEN (zopakovat 5x)

- do každé jamky 250 μ L PBS+TWEEN
- promíchat, vylít do odpadu, vyklepnout, eventuálně použít promývačku
- po posledním promytí důkladně vše vyklepnout - poklepáním na podložku/filtr. papír

l) Přidávání substrátu (tj. TMB) pro enzymatickou reakci HRP

Do každé jamky přidat 175 μ L substrátu (TMB) multikanálovou pipetou - je uchováván v lednici 4°C, předem třeba vytemperovat na teplotu laboratoře.

Inkubovat cca 5 až 15 minut - sledovat vývoj modré barvy (!!!)

V případě rychlé reakce je lepší reakci zastavit dříve pro dobré odlišení negativní kontroly a MC: NEGATIVNÍ KONTROLA (výrazná barva)

nejvyšší koncentrace MC 2.0 μ g/L (nejpomalejší reakce - málo barvy)

m) Zastavit reakci přidavkem 75 μ L 5% H₂SO₄ (v/v) multikanálovou pipetou ve stejném pořadí v jakém se dávkovala barva.

n) Promíchat a změřit Absorbanci na mikrodestičkovém spektrofotometru TECAN – Genios – v režimu dual 420 / 660 nm.

15) Kontrola kvality

Test je validní když:

- existuje významný rozdíl v hodnotách absorbance (A) negativní kontroly - vysoká A a MC 2 μ g/L
- nízká A
- A kalibračního roztoku MC 0.125 je nižší než A negativní kontroly (cca 80-95% hodnoty negativní kontroly), *tato nejnižší koncentrace splňující tyto podmínky je mezi detekce (LOD).*
- existuje kvalitní kalibrační křivka ($A \sim \ln(c)$) v rozmezí 0.125 - 2 μ g/L

16) Výstup - protokol / výpočet

- spočítat průměrné hodnoty A_{420/660}

NEG. KONTROLA / MC 0.125 / MC 0.5 / MC 2 / VZOREK

- spočítat %A (vůči negativní kontrole) pro jednotlivé vzorky/kalibrace:

$$\%A = (A_{\text{vzorek}} / A_{\text{neg. kontrola}}) \times 100 [\%]$$

- v Excelu vytvořit kalibrační křivku $A_{420/660} = a \cdot \ln(\text{MC}) + b$

17) Poznámky, doplňky:

Výpočet výsledku

1) Je-li A_{420/660}_VZOREK \geq A_{420/660}_NEG. KONTROLA

=> koncentrace je < 0.125 μ g/L (tj. < LOD)

2) Je-li A_{420/660}_VZOREK v rozmezí kalibrační křivky

=> dosadí se A_vzorek do rovnice kalibrační závislosti a odečte se koncentrace [μ g/L]

3) Je-li A_{420/660}_VZOREK < A_{420/660}_MC2

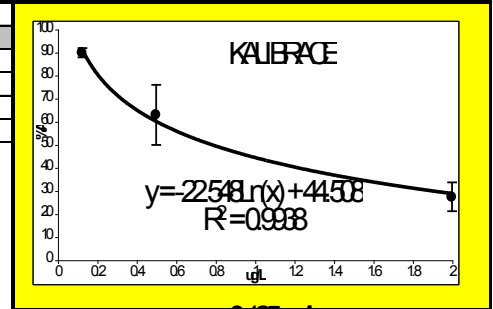
=> koncentrace ve vzorku je > 2 µg/L a vzorek je třeba ředit, aby se koncentrace (a tím absorbance) dostala do rozmezí kalibrační křivky

Příklad výstupu

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0.280	0.27	0.277	0.084	0.075	0.074	0.231	0.226	0.233	0.257	0.217	0.232	0.228
0.243	0.253	0.248	0.254	0.24	0.238	0.259	0.212	0.21	0.237	0.221	0.228	0.228
0.150	0.176	0.195	0.247	0.225	0.218	0.092	0.089	0.099	0.181	0.135	0.147	0.147
0.072	0.074	0.081	0.268	0.25	0.245	0.14	0.135	0.141	0.087	0.079	0.087	0.087
0.266	0.261	0.276	0.065	0.085	0.083	0.101	0.097	0.099	0.24	0.231	0.238	0.238
0.266	0.267	0.274	0.219	0.204	0.205	0.167	0.183	0.177	0.069	0.074	0.069	0.069
0.315	0.304	0.311	0.052	0.052	0.054	0.211	0.069	0.077	0.091	0.088	0.088	0.088
U.250	U.559	U.652	U.655	U.654	U.655	U.655	U.655	U.655	U.124	U.123	U.123	U.123

Kalibrace	A1	A2	A3	puner	smoother	Koef.var	%A
0.280	0.270	0.277	0.276	0.005	19	100	900
0.125	0.243	0.253	0.248	0.248	0.005	20	630
0.05	0.150	0.176	0.195	0.174	0.023	130	630
2	0.072	0.074	0.081	0.076	0.005	62	274

rovnice
 $y = -22548 \ln(x) + 44508$



KV>15

c<0.125ug/L
 c>2ug/L

Vzorek	A1	A2	A3	puner	smoother	koef.var	%A	janlac [ug/L]	vzorek rečen	uvodk. vysledek [ug/L]
1	0.266	0.261	0.276	0.268	0.006	2	97.1	0.125	1	0.125
2	0.266	0.267	0.274	0.269	0.004	1	97.6	0.125	1	0.125
3	0.315	0.314	0.311	0.310	0.005	1	1125	0.125	1	0.125
4	0.069	0.069	0.062	0.061	0.002	2	219	0.2	1	0.2
5	0.084	0.075	0.074	0.078	0.004	6	282	2.064	1	0.2
6	0.254	0.240	0.238	0.244	0.007	3	885	0.142	1	0.142
7	0.247	0.225	0.218	0.230	0.012	5	834	0.178	1	0.178
8	0.268	0.250	0.245	0.254	0.010	4	923	0.125	1	0.125
389	0.085	0.083	0.084	0.084	0.001	1	305	1.864	1	1.864
477	0.219	0.204	0.205	0.209	0.007	3	759	0.248	1	0.248
494	0.052	0.054	0.054	0.053	0.001	2	193	0.2	1	0.2
491	0.068	0.064	0.068	0.063	0.004	6	230	0.2	1	0.2
166	0.231	0.226	0.233	0.230	0.003	1	834	0.178	1	0.178
139	0.212	0.210	0.210	0.211	0.001	0	765	0.242	1	0.242
470	0.092	0.089	0.089	0.088	0.004	4	339	1.604	1	1.604
282	0.140	0.135	0.141	0.139	0.003	2	503	0.773	1	0.773
258	0.101	0.097	0.099	0.099	0.002	2	359	1.464	1	1.464
364	0.205	0.183	0.177	0.188	0.012	6	683	0.348	1	0.348
490	0.069	0.069	0.077	0.073	0.004	3	265	0.2	1	0.2
181	0.088	0.088	0.088	0.088	0.000	0	210	0.2	1	0.2
465	0.257	0.217	0.232	0.235	0.016	7	854	0.163	1	0.163
533	0.237	0.221	0.228	0.229	0.007	3	830	0.182	1	0.182
418	0.135	0.147	0.147	0.141	0.006	4	511	0.745	1	0.745
301	0.087	0.079	0.087	0.084	0.004	4	306	1.864	1	1.864
210	0.240	0.231	0.238	0.236	0.004	2	857	0.161	1	0.161
399	0.069	0.074	0.069	0.071	0.002	3	256	0.2	3	0.6
517	0.091	0.088	0.088	0.089	0.001	2	323	1.720	3	5.159
5	0.124	0.123	0.130	0.126	0.003	2	450	0.953	1	0.953

Problémy vzniklé při analýze metodou ELISA:

1. Nevalidní kalibrace

- kalibrační roztoky nebyly řádně napipetovány a promíchány při přípravě
- konjugát HRP-MC obsahuje větší množství volného MC-LR, který se z vazby s HRP časem uvolnil a v absorbanci kalibračních roztoků tak neexistují velké rozdíly (křivka se "splošťuje"). Pomůže přečištění konjugátu gelovou chromatografií na sephadexových kolonkách.
- sekundární protilátka MAb je moc nebo málo koncentrovaná! V tomto případě se musí udělat optimalizační deska, která bude obsahovat různé ředění MAb (Např. 5000x, 3000x, 1500x, 500x) a kalibrační roztoky a tím získáme její ideální ředění.

2. Výrazně rozdílné absorbance triplikátů

- chybné pipetování
 - nehomogenní vzorek (nedostatečně zbavený zbytků biomasy a nečistot)
 - nehomogenní konjugát HRP-MC (nedostatečně promíchaný roztok)
 - málo nakoutovaná deska první protilátkou IgG (protilátka může ztrácet aktivitu, je nutno ji zakoncentrovat), nespecifická vazba druhé protilátky také přímo na desku.
 - kontaminace jamek při vyklepávání a promývání desky
- Pokud je koeficient variance mezi triplikáty větší jak 15%, tak se vždy podívat na reálné hodnoty absorbancí. Pokud se jedna z nich výrazně liší od dvou ostatních, tuto hodnotu vyškrtnout.

3. Enzymatická reakce probíhá příliš dlouho (substrát TMB se vybarvuje více jak 15 min)

- málo nakoutovaná deska druhou protilátkou MAb (protilátka může ztrácet aktivitu, je nutno ji zakoncentrovat).
- "starnoucí" konjugát, opět je nutno ho zakoncentrovat

4. Falešně pozitivní nebo negativní výsledky

- přítomnost organických rozpouštědel
- přímé sluneční světlo
- teplota vyšší než 30°C
- extrémní pH, velké množství solí, detergentů, huminových kyselin, oxidačních látek
- vliv matrice (především u vzorků tkání, sedimentů)

Příloha č. 1

k SOP-CCT-CYANOTOX-ELISA (Stanovení microcystinů s využitím ELISA)

Příprava konjugátu HRP (křenové peroxidázy) s MC-LR (microcystinem)

A.Zeck et al./Analytica Chimica Acta 441 (2001) 1-13

Chemikálie:

HRP (horse redish peroxidase) SIGMA 25000 U, type II

Trautovo reagent (2-iminothiolane hydrochloride) PIERCE

Sephadexová kolonka G20?

Pufry:

PBS standardní

Triethanolamin pufr 50mM; 0,15M NaCl; 1mM EDTA *2H₂O; pH8

Borátový pufr 0,1M; pH9,2

Postup:

Navážku 10mg HRP v tmavé vialce rozpustit 0,5ml triethanolaminovým pufrem a přidat 150ul trautova reagentu ze zásobního roztoku. Zásobní roztok trautova reagentu se připraví rozpuštěním 4mg látky v 1ml vody.

Odstranit O₂ vyfoukáním dusíkem. Uzavřít vialku víčkem s butyl/PTFE septem a 15minut míchat na míchačce nejlépe obalené alobalem při laboratorní teplotě.

Přidat opět 50ul trautova reagentu ze zásobního roztoku, odstranit O₂ vyfoukáním dusíkem a míchat reakční směs 2 hodiny při laboratorní teplotě.

Nezreagované trautovo činidlo odstranit gelovou chromatografií na sephadexové kolonce, která byla předtím kalibrována PBS standardním.

K odebrané nahnědlé frakci (HRP+trautovo činidlo), která vytýká jako první z kolonky, přidáme 138ul roztoku MC-LR(1,5g/l) a upravíme pH vzniklé reakční směsi na hodnotu pH8 přidavkem asi 40ul borátového pufru.

Reakční směs mícháme přes noc při laboratorní teplotě a ve tmě (obalené alobalem).

Nezreagovaný MC-LR odstraníme a konjugát přečistíme 3x opět pomocí gelové chromatografie na sephadexové kolonce.

Pro zjištění výtěžnosti reakce - množství zreagovaného MC-LR je třeba odebrat první vytýkající roztok MC-LR z kolonky a pomocí HPLC určit koncentraci nezreagovaného microcystinu.

Konjugát s přidavkem 5%BSA rozpipetovat po malých objemech (např. 50ul) a dlouhodobě uchovávat v mrazáku. Jednou rozmražené vzorky lze znovu zmrazit a použít.

"Ředění nového konjugátu v metodě ELISA pro stanovení microcystinů je třeba znovu nakalibrovat".

Příloha č. 2

k SOP-CCT-CYANOTOX-ELISA (Stanovení microcystinů s využitím ELISA)

Příprava pufrů pro ELISA

Uhličitanový pufr 40mM, pH 9.6

Navážky:

Na₂CO₃ bezvodý (Mr.105,99) 0,53g rozpustit v 50ml vody

NaHCO₃ (Mr. 84,01) 0,82g rozpustit ve 100ml vody

K asi 100 ml roztoku NaHCO₃ přidávat pomalu za stálého míchání a měření pH asi 30-40ml roztoku Na₂CO₃ do konečné hodnoty pH 9,6. Vzniklý koncentrovaný 0,1M roztok dále zředíme 2,5x. (např. ke 100ml 0,1M přidáme 150ml vody a získáme 250ml roztoku 40mM). Na závěr znovu změříme a eventuelně upravíme pH na hodnotu 9,6 pomocí kapek 1M HCl, event. 1M NaOH.

Pufr uchováváme při laboratorní teplotě.

PBS 80mM, 8.76g/l NaCl, pH 7.4

Navážky:

Na₂HPO₄*12H₂O (Mr.358,14) 1,14g rozpustit ve 100ml vody

KH₂PO₄ (Mr.136.1) 0,272g rozpustit ve 25ml vody

NaCl 0,876g rozpustit ve 100ml PBS

Ke 100ml roztoku Na₂HPO₄ přidávat po kapkách za stálého míchání a měření pH KH₂PO₄ (asi 7ml) do požadované hodnoty pH 7,4. V připraveném roztoku rozpustit 0,88g NaCl.

Pufr uchováváme při laboratorní teplotě.

PBS 7mM, 150mM NaCl, pH 7.6

Použít PBS standardní, připravené podle SOP č.3 VUVeL, pufr nemusí být sterilní, uchováváme při teplotě laboratoře

PBS 7mM, 150mM NaCl, 5% TWEEN 20, pH 7.6

Ke 100ml PBS standardního, připraveném podle SOP č.3 VUVeL, přidat 0,05ml TWEEN 20 a promíchat. Pufr nemusí být sterilní, uchováváme při teplotě laboratoře.

TRIS 0.1M, 8.76g/l NaCl, pH 7.4

Navážky:

TRIS (Mr.121,1) 1,21g rozpustit ve 25ml vody

NaCl 0,876g rozpustit ve 25ml TRIS pufru

Ke 25ml TRIS pufru s NaCl přidávat pomalu po kapkách za stálého míchání a měření pH na pH metru asi 5-7ml 1M HCl až do konečné hodnoty pH 7,4. Vzniklý roztok doplnit vodou do

výsledného objemu 100ml a ještě jednou změříme pH, eventuelně upravíme na hodnotu 7,4 pomocí kapek 1M HCl event. 1M NaOH.

Pufr uchováváme při laboratorní teplotě.

TRIS 1M, 87.6g/l NaCl, 1% BSA, 1% EDTA, pH 7.4

Navážky:

TRIS	(Mr.121,1)	6,04g rozpustit ve 10ml vody
NaCl		4,34g rozpustit ve 10ml TRIS pufru
BSA		0,5g
EDTA*2H2O	(Mr. 328)	0,5g

K 10ml TRIS pufru s NaCl přidávat pomalu za stálého míchání a měření pH na pH-metru asi 15-20ml 1M HCl až do konečné hodnoty pH 7,4. Vzniklý roztok doplnit vodou do výsledného objemu 50ml.

V 1M TRIS pufru rozpustíme 0,5g BSA a 0,5g EDTA*2H2O a ještě jednou změříme pH, eventuelně upravíme na hodnotu 7,4 pomocí kapek 1M HCl event. 1M NaOH.

Vzniklý roztok přefiltrujeme a dále uchováváme při 4°C v lednici.

Příloha č. 3

k SOP-CCT-CYANOTOX-ELISA (Stanovení microcystinů s využitím ELISA)

Příprava pufrů, používaných při přípravě konjugátu microcystinu (MC-LR) s peroxidázou (HRP) pomocí "Trautova reagents"

Triethanolaminový pufr 50mM, 150mM NaCl, 1mM EDTA, pH 8.0

Navážky:

Triethanolamin	(Mr.)	0,0746g rozpustit v 1ml vody
NaCl		0,0877g rozpustit v 1ml triethanolaminovém pufru
EDTA*2H ₂ O	(Mr. 328)	0,0366g rozpustit v 1ml triethanolaminovém pufru

K triethanolaminovému pufru s EDTA a NaCl přidávat po kapkách 0,05M NaOH (0,05M HCl) do požadované hodnoty pH 8. Vzniklý roztok doplníme vodou do konečného objemu 10ml, znovu přeměříme hodnotu pH a eventuelně upravíme na požadovanou hodnotu pH pomocí roztoků NaOH (HCl).

Borátový pufr 100mM, pH 9.2

Navážky:

H ₃ BO ₃	(Mr.)	0,0248g rozpustit ve 4ml vody
--------------------------------	-------	-------------------------------

Ke 4ml borátového pufru přidávat po kapkách 200ul 1M NaOH. Požadovanou hodnotu pH 9.2 získáme přidáním kapek (asi 80ul) 0,1M HCl eventuelně kapky 1M HCl.