

## 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)

Pufr na promývání mezi IgG a MAb.

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

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

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

Pufr na ředění konjugátu.

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 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 pufr 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 eppendorfci + 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) - „tetramethylbenzedine“ - 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 (*kozi 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 překryt 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  $\mu\text{L}$ , do 10-100  $\mu\text{L}$ , do 100-1000  $\mu\text{L}$
- 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  $\mu\text{L}$ /jamku.

(*Celkový potřebný objem spočítat předem - např. na desku = 96 jamek  $\times$  250  $\mu\text{L}$  = 24 mL + rezerva 1 mL => 12.5  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  PBS (standardní)
- promíchat, vylít do odpadu, vyklepnout, (případně použít promývačku)

c) Krytí desek MAb:

Zamraženou 10x zředěnou MAb(1dílná MAb:9dílný 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. 1dílná zamražená 10x ředěná MAb z eppendorfky / 299dílný pufru). Důkladně promíchat - vortexovat !!!.

Dávkovat po 250  $\mu\text{L}$ /jamku.

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

Dávkovat 250  $\mu$ 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  $\mu$ L PBS+TWEEN

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

g) Dávkování blokačního roztoku

Do každé jamky dávkovat 20  $\mu$ 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 H<sub>2</sub>O (koncentrace microcystinu-LR 0.125, 0.5 a 2  $\mu$ g/L je vhodné připravit ředěním z koncentrovaného roztoku MC-LR 2 $\mu$ g/mL v den analýzy, je třeba dbát na dobré promíchání roztoků - vortexování, zásobní roztok MC-LR 2 $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ L z pomocné desky multikanálovou pipetou, do které byly vzorky a kalibrační roztoky (MC-LR 0.125 / 0.5 / 2  $\mu$ g/L) a blank (destilovaná H<sub>2</sub>O) předem napipetovány v triplicátech a s rezervou 200+30  $\mu$ 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 puftru (ředění 300x, tj. 1:299 v puftru 0.1 M TRIS).

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

Dávkovat multikanálovou pipetou do každé jamky po 50  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ g/L (nejpomalejší reakce - málo barvy)*

m) Zastavit reakci přídatkem 75  $\mu$ L 5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (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  $\mu$ 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  $\mu$ g/L

16) Výstup - protokol / výpočet

- spočítat průměrné hodnoty A<sub>420/660</sub>

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<sub>420/660</sub>\_VZOREK  $\geq$  A<sub>420/660</sub>\_NEG. KONTROLA

=> koncentrace je < 0.125  $\mu$ g/L (tj. < LOD)

2) Je-li A<sub>420/660</sub>\_VZOREK v rozmezí kalibrační křivky

=> dosadí se A\_vzorek do rovnice kalibrační závislosti a odečte se koncentrace [ $\mu$ g/L]

3) Je-li A<sub>420/660</sub>\_VZOREK < A<sub>420/660</sub>\_MC2

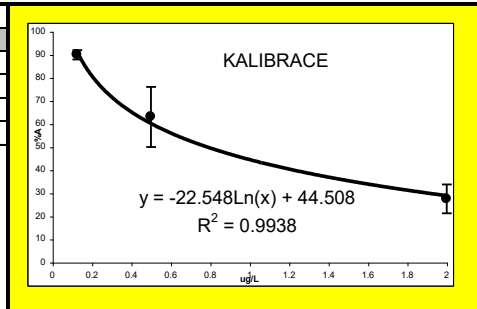
=> koncentrace ve vzorku je > 2 µg/L a vzorek je třeba ředit, aby se koncentrace (a tím absorbance) dostala do rozmezí kalibrační křivky

### Příklad výstupu

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
blank	0.280	0.27	0.277	0.084	0.075	0.074	0.231	0.226	0.233	0.257	0.217	0.232
0,125 ug/L	0.243	0.253	0.248	0.254	0.24	0.238	0.259	0.212	0.21	0.237	0.221	0.228
0.15	0.150	0.176	0.195	0.247	0.225	0.218	0.092	0.089	0.099	0.181	0.135	0.147
2 ug/L	0.072	0.074	0.081	0.268	0.25	0.245	0.14	0.135	0.141	0.087	0.079	0.087
E	0.266	0.261	0.276	0.065	0.085	0.083	0.101	0.097	0.099	0.24	0.231	0.238
F	0.266	0.267	0.274	0.219	0.204	0.205	0.167	0.183	0.177	0.069	0.074	0.069
G	0.315	0.304	0.311	0.052	0.052	0.054	0.211	0.069	0.077	0.091	0.088	0.088
H	0.290	0.059	0.062	0.068	0.064	0.066	0.058	0.058	0.073	0.124	0.123	0.13

Kalibrace	A1	A2	A3	prumer	smoch	koef.var	%A
blank	0.280	0.270	0.277	0.276	0.005	1.9	100
0.125	0.243	0.253	0.248	0.248	0.005	2.0	90.0
0.5	0.150	0.176	0.195	0.174	0.023	13.0	63.0
2	0.072	0.074	0.081	0.076	0.005	6.2	27.4

rovnice:  
 $y = -22.548 \ln(x) + 44.508$



k.v.>15  
 c<0,125 ug/L  
 c>2 ug/L

Vzorek	A1	A2	A3	prumer	smoch	koef.var	%A	jamka c [ug/L]	vzorek ředěn	MC-LR výsledná c [ug/L]
1	0.266	0.261	0.276	0.268	0.006	2	97.1	c<0.125	1	c<0.125
2	0.266	0.267	0.274	0.269	0.004	1	97.6	c<0.125	1	c<0.125
3	0.315	0.304	0.311	0.310	0.005	1	112.5	c<0.125	1	c<0.125
4		0.059	0.062	0.061	0.002	2	21.9	c>2	1	c>2
5	0.084	0.075	0.074	0.078	0.004	6	28.2	2.064	1	c>2
6	0.254	0.240	0.238	0.244	0.007	3	88.5	0.142	1	0.142
7	0.247	0.225	0.218	0.230	0.012	5	83.4	0.178	1	0.178
8	0.268	0.250	0.245	0.254	0.010	4	92.3	c<0.125	1	c<0.125
559		0.085	0.083	0.084	0.001	1	30.5	1.864	1	1.864
477	0.219	0.204	0.205	0.209	0.007	3	75.9	0.248	1	0.248
494	0.052	0.054	0.054	0.053	0.001	2	19.3	c>2	1	c>2
491	0.068	0.064	0.058	0.063	0.004	6	23.0	c>2	1	c>2
166	0.231	0.226	0.233	0.230	0.003	1	83.4	0.178	1	0.178
139		0.212	0.210	0.211	0.001	0	76.5	0.242	1	0.242
470	0.092	0.089	0.099	0.093	0.004	4	33.9	1.604	1	1.604
282	0.140	0.135	0.141	0.139	0.003	2	50.3	0.773	1	0.773
258	0.101	0.097	0.099	0.099	0.002	2	35.9	1.464	1	1.464
364	0.205	0.183	0.177	0.188	0.012	6	68.3	0.348	1	0.348
490		0.069	0.077	0.073	0.004	5	26.5	c>2	1	c>2
181	0.058	0.058		0.058	0.000	0	21.0	c>2	1	c>2
465	0.257	0.217	0.232	0.235	0.016	7	85.4	0.163	1	0.163
533	0.237	0.221	0.228	0.229	0.007	3	83.0	0.182	1	0.182
418		0.135	0.147	0.141	0.006	4	51.1	0.745	1	0.745
301	0.087	0.079	0.087	0.084	0.004	4	30.6	1.854	1	1.854
210	0.240	0.231	0.238	0.236	0.004	2	85.7	0.161	1	0.161
399	0.069	0.074	0.069	0.071	0.002	3	25.6	c>2	3	c>6
517	0.091	0.088	0.088	0.089	0.001	2	32.3	1.720	3	5.159
5	0.124	0.123	0.130	0.126	0.003	2	45.6	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\*2H<sub>2</sub>O; 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 O<sub>2</sub> 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 O<sub>2</sub> 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:

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> bezvodý (Mr.105,99)	0,53g rozpustit v 50ml vody
NaHCO <sub>3</sub> (Mr. 84,01)	0,82g rozpustit ve 100ml vody

K asi 100 ml roztoku NaHCO<sub>3</sub> přidávat pomalu za stálého míchání a měření pH asi 30-40ml roztoku Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 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:

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *12H <sub>2</sub> O (Mr.358,14)	1,14g rozpustit ve 100ml vody
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Mr.136.1)	0,272g rozpustit ve 25ml vody
NaCl	0,876g rozpustit ve 100ml PBS

Ke 100ml roztoku Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> přidávat po kapkách za stálého míchání a měření pH KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (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*2H <sub>2</sub> O	(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\*2H<sub>2</sub>O 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 <sub>2</sub> 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 <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	(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.