



Arbeitsanleitung

Nor- / Metanephrin - ELISA

Enzymimmunoassay

für die quantitative Bestimmung von


**freiem
Normetanephrin und Metanephrin**


in Plasma

CE

IVD

REF EA612/192

 2 x 96

 2 – 8 °C

DLD Gesellschaft für Diagnostika und medizinische Geräte mbH
Adlerhorst 15 • 22459 Hamburg • Telephone: +49-40-555 87 10 • Fax: +49-40-555 87 111
Internet: <http://www.dld-diagnostika.de> • E-Mail: contact@dld-diagnostika.de

September 2009

Inhaltsverzeichnis

| | | | |
|-----|------------------------------------|-------|----|
| 1. | Einleitung und Testprinzip | Seite | 5 |
| 2. | Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen | Seite | 5 |
| 3. | Lagerung und Haltbarkeit | Seite | 6 |
| 4. | Inhalt des Testbestecks | Seite | 6 |
| 5. | Probengewinnung und -lagerung | Seite | 8 |
| 6. | Probenvorbereitung | Seite | 8 |
| 7. | Testdurchführung | Seite | 11 |
| | Metanephrin | Seite | 11 |
| | Normetanephrin | Seite | 12 |
| 8. | Auswertung | Seite | 13 |
| 9. | Testcharakteristika | Seite | 13 |
| 10. | Literatur | Seite | 17 |
| 11. | Pipettierschema Probenvorbereitung | Seite | 19 |
| 12. | Pipettierschema ELISA | Seite | 20 |

1. Einleitung und Testprinzip

Normetanephrin und Metanephrin sind physiologische Abbauprodukte der Catecholamine, aus denen sie durch das Enzym Catechol-O-methyltransferase (COMT) gebildet werden. Sie werden in erhöhten Konzentrationen beim Phäochromozytom, Ganglioneurom und verwandten Tumoren neurogenen Ursprungs gefunden.

Der vorliegende Test-Kit enthält Reagenzien für die quantitative Bestimmung von unkonjugiertem Normetanephrin und Metanephrin in EDTA-Plasma. Normetanephrin und Metanephrin werden durch das Acylierungs-Reagenz quantitativ in ihre N-Acyl-Derivate umgewandelt. Die Durchführung des ELISA-Tests folgt den Grundprinzipien des kompetitiven Enzymimmunoassays: Metanephrin bzw. Normetanephrin sind an die Festphase der Mikrotiterplatte gebunden. Acylierte Nor-/Metanephrene aus der Probe und an die Festphase gebundene Nor-/Metanephrene konkurrieren um eine definierte Anzahl von Antikörper-Bindungsstellen. Wenn sich das System im Gleichgewicht befindet, wird der nicht-gebundene Antigen-Antikörper-Komplex in einem Waschschrift entfernt und der entsprechend gebundene Komplex mittels eines Anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase-Konjugats nachgewiesen und über den Umsatz von Tetramethylbenzidin (TMB) bestimmt. Die TMB/POD-Reaktion wird gestoppt und bei 450 nm gemessen. Die Konzentration des an die Festphase gebundenen Antigen-Antikörper-Komplexes ist umgekehrt proportional zur Konzentration der Nor-/Metanephrene .

2. Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

- Dieser Kit ist lediglich zum in vitro-Gebrauch bestimmt.
- Die angegebenen Verfallsdaten sind unbedingt zu beachten.
- Die Reagenzien bis zur Verwendung bei 2 - 8 °C lagern.
- Während der Testdurchführung Einmal-Handschuhe tragen.
- Einige der Reagenzien enthalten als Konservierungsmittel Natriumazid. Verschlucken und Berühren mit der Haut vermeiden.
- Alle Reagenzien dieses Testbestecks, die humanen Ursprungs sind, ergaben bei der Prüfung auf HBsAg, HCV bzw. HIV I/II-Antikörper ein negatives Ergebnis. Trotzdem kann das Vorhandensein solcher infektiöser Erreger nicht mit absoluter Sicherheit ausgeschlossen werden. Die Reagenzien sollten deshalb wie potentiell infektiöses Material behandelt werden. Alle Reagenzien dieses Testbestecks, die tierischen Ursprungs sind, stammen von gesunden Tieren, die von einer zertifizierten Stelle untersucht wurden. Die Reagenzien sollten trotzdem wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.
- Ein Teil der Komponenten dieses Testbestecks sind kennzeichnungspflichtig. Diese Komponenten tragen das entsprechende Gefahrensymbol auf ihrem Etikett.

3. Lagerung und Haltbarkeit

Die Reagenzien sollen bei 2 – 8 °C gelagert werden.

Das Verfallsdatum sowie die Chargenbezeichnung sind auf jedem Fläschchen bzw. Kit angegeben. Bei größeren Ansätzen möglichst nur Reagenzien einer Charge verwenden.

4. Inhalt des Testbestecks

Reagenzien für die Probenvorbereitung:

4.1 **Acylierungs-Reagenz** **ACYL-REAG** 2 Fläschchen
2,5 ml, Lyophilisat

4.2 **Acylierungs-Puffer** **ACYL-BUFF** 1 Fläschchen
4 ml, gebrauchsfertig
Tris-HCl-Puffer

4.3 **Standards 1 - 6** **CAL 1 – 6** 6 Fläschchen
Je 1,75 ml, lyophilisiert
Konzentrationen variabel, siehe Q.C.-Zertifikat

| Standard | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|-------------------------------|---|----|----|-----|-----|-------|
| Normetanephrin (pg/ml) | 0 | 20 | 60 | 200 | 700 | 3.000 |
| Metanephrin (pg/ml) | 0 | 20 | 60 | 200 | 700 | 3.000 |

4.4 **Kontrolle 1 & 2** **CON 1 & 2** 2 Fläschchen
Je 1,75 ml, lyophilisiert
Konzentrationen: Siehe Q.C.-Zertifikat

4.5 **Präzipitator 1** **PRECI 1** 1 Fläschchen
6 ml, gebrauchsfertig

4.6 **Präzipitator 2** **PRECI 2** 1 Fläschchen
6 ml, gebrauchsfertig

4.7 **Präzipitations-Tubes** **PRECI-TUBE** 100 Stück

4.8 **Reaktions-Platte** **ACYL-PLATE** 1 Stück
Platte mit 96 Vertiefungen

Reagenzien für den ELISA

- 4.9 **MT-Streifen mit Halterahmen** 2 x 12 Streifen
STRIPS-MN **STRIPS-NMN**
Mikrotiterstreifen mit je 8 Kavitäten, einzeln abbrechbar
beschichtet mit Metanephrin (12 Streifen), blau markiert,
und Normetanephrin (12 Streifen), gelb markiert
- 4.10 **Metanephrin-Antiserum** **AS-MN** 1 Fläschchen
3 ml, gebrauchsfertig, vom Kaninchen,
blau gefärbt
- 4.11 **Normetanephrin-Antiserum** **AS-NMN** 1 Fläschchen
5,5 ml, gebrauchsfertig, vom Kaninchen,
gelb gefärbt
- 4.12 **Enzym-Konjugat** **CONJ** 1 Fläschchen
21 ml, gebrauchsfertig
Anti-Kaninchen IgG-POD Konjugat
- 4.13 **Waschpuffer Konzentrat** **WASH** 2 Fläschchen
20 ml, Konzentrat
Inhalt mit bidest. Wasser auf 500 ml auffüllen
- 4.14 **Substrat** **SUB** 1 Fläschchen
21 ml TMB-Lösung, gebrauchsfertig
- 4.15 **Stopplösung** **STOP** 1 Fläschchen
21 ml, gebrauchsfertig
Enthält 0,3M Schwefelsäure
- 4.16 **Solvent** **SOLVENT** 1 Fläschchen
6 ml, gebrauchsfertig
Enthält Aceton
(bitte beachten: Solvent greift Plastik an; Solvent reagiert
nicht mit normalen Pipettenspitzen und Glasgefäßen)
- 4.17 **Haftklebefolie** **FOIL** 2 Stück
Gebrauchsfertig

Weiter werden benötigt (nicht im Kit enthalten):

- Pipetten für 20, 25, 50, 100 µl und 400 µl
- Schüttler (horizontal), mittlere Schüttelfrequenz, ca. 400 – 500 rpm
- Zentrifuge mit mind. 3.000 x g
- Vortex-Mixer, dest. Wasser
- Photometer für die Auswertung von Mikrotiterplatten

5. Probengewinnung und -lagerung

Plasma

Für den Test sollte nur EDTA-Plasma eingesetzt werden. Bei der Blutentnahme müssen bestimmte Vorsichtsmaßnahmen beachtet werden, da durch psychische und physische Belastungen des Patienten die Konzentration der Catecholamine stark ansteigen kann. Es empfiehlt sich, dass der Patient mit liegender Kanüle ruht und die Blutentnahme erst 20 - 30 Minuten nach Venenpunktion erfolgt.

Hämolytische und lipämische Plasmen sollten im Assay nicht eingesetzt werden, da sie zu falsch niedrigen Werten führen können.

Das Plasma kann bis zu 6 Stunden bei 2 -8 °C gelagert werden. Proben, die nicht sofort in dem Test eingesetzt werden, können bei -20 °C mindestens 6 Monate gelagert werden.

6. Probenvorbereitung

Die Vorbereitung der Standards, Plasmaproben und Kontrollen ist für Normetanephrin und Metanephrin gleich.

Alle Reagenzien auf Raumtemperatur bringen.

6.1 Vorbereitung der Reagenzien

Standards und Kontrollen

Standards und Kontrollen mit 1,75 ml dest. Wasser auflösen und gut mischen. Die aufgelösten Standards und Kontrollen können bei – 20 °C gelagert werden und dürfen nur einmal aufgetaut werden.

Acylierungs-Reagenz

Je Fläschchen mit 2,5 ml Solvent lösen und ca. 5 Minuten auf einem Schüttler mischen. Das Acylierungsreagenz sollte unmittelbar vor Gebrauch frisch angesetzt werden. Durch die 2. Flasche im Kit ist der ELISA in zwei Ansätzen teilbar. Wenn der Kit in einem Ansatz verbraucht wird, den aufgelösten Inhalt beider Fläschchen poolen. Nach Gebrauch ist das Restreagenz zu verwerfen.

Bitte beachten, daß Solvent mit vielen Plastikmaterialien reagiert, z.B. Plastikschälchen für Mehrkanalpipetten. Solvent reagiert nicht mit normalen Pipettenspitzen und mit Glasgefäßen.

Achtung

Solvent ist leicht flüchtig und verdampft schnell. Daher bitte keine Gefäße zusammen mit Mehrkanalpipetten verwenden, da sie eine hohe Oberfläche haben. Bitte Multipetten o. ä. verwenden, das aufgelöste

Acylierungsreagenz aus dem Fläschchen in die Spritze (über eine aufgesetzte Pipettenspitze) ziehen und Vertiefung für Vertiefung pipettieren.

Alle anderen Reagenzien sind gebrauchsfertig.

6.2 Präzipitation

Reagenzien und Proben auf Raumtemperatur bringen.

Es empfiehlt sich Doppelbestimmungen anzusetzen. Bei wenig Probenmaterial kann die Präzipitation in Einfach- und die anschließende Acylierung in Doppelbestimmung angesetzt werden.

1. Je 400 µl der aufgelösten Standards, Kontrollen und Plasmaproben in die mitgelieferten und entsprechend beschrifteten Präzipitations-Tubes pipettieren.
2. Je 50 µl Präzipitator 1 in die Präzipitations-Tubes pipettieren.
3. Je 50 µl Präzipitator 2 in die Präzipitations-Tubes pipettieren.
4. Tubes gut verschließen und gut mischen (Vortex).
5. Tubes 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
6. Tubes 10 Minuten bei mind. 3.000 x g zentrifugieren

Für die nachfolgende Acylierung je 100 µl des Überstandes verwenden.

6.3 Acylierung

1. Je 100 µl des Überstandes in die entsprechenden Vertiefungen der Reaktionsplatte für die Acylierung pipettieren.
2. Je 25 µl Acylierungs-Puffer in jede Vertiefung pipettieren.
3. Acylierungs-Reagenz frisch lösen und ca. 5 Minuten auf einem Schüttler mischen.

4. Je 20 µl gelöstes Acylierungs-Reagenz in jede einzelne Vertiefung pipettieren und sofort mit Schritt 5. folgen.

Achtung

Solvent ist leicht flüchtig und verdampft schnell. Daher bitte keine Gefäße zusammen mit Mehrkanalpipetten verwenden, da sie eine hohe Oberfläche haben. Bitte Multipipetten o. ä. verwenden, das aufgelöste Acylierungsreagenz aus dem Fläschchen in die Spritze (über eine aufgesetzte Pipettenspitze) ziehen und Vertiefung für Vertiefung pipettieren.

5. Reaktionsplatte 60 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Orbital-Schüttler bei 400 bis 500 rpm inkubieren, nicht abkleben oder zudeckeln, Platte offen schütteln.

Für den nachfolgenden ELISA je 50 µl für Metanephrin und je 20 µl für Normetanephrin aus den Vertiefungen entnehmen.

7. Testdurchführung

7.1 Vorbereitung der Reagenzien

Waschpuffer Konzentrat

Inhalt des Fläschchens mit destilliertem Wasser auf 500 ml Endvolumen auffüllen.

7.2.1

Metanephrin-ELISA

Reagenzien auf Raumtemperatur bringen. Es empfiehlt sich, Doppelbestimmungen anzusetzen.

1. Je 50 µl acylierte Standards 1 - 6, Kontrollen und Patientenproben in die entsprechenden Vertiefungen der Mikrotiterstreifen pipettieren.
2. Je 25 µl Metanephrin-Antiserum in alle Vertiefungen pipettieren.
3. Platte mit Folie abdecken und 15 bis 20 Stunden bei 2-8 °C inkubieren.
4. Vertiefungen entleeren, mit ca. 300 µl verdünntem Waschpuffer füllen und wieder entleeren. Diesen Vorgang insgesamt 3 mal durchführen. Anschließend die Mikrotiterstreifen umgedreht auf eine saugfähige Unterlage (Papierhandtuch) legen und kurz ausklopfen, um alle Flüssigkeitsreste zu entfernen.
5. Je 100 µl Enzym-Konjugat in alle Vertiefungen pipettieren.
6. 30 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Orbitalschüttler bei 400 bis 500 rpm inkubieren.
7. Waschen: Wie unter Punkt 4 beschrieben.
8. Je 100 µl Substrat in alle Vertiefungen pipettieren.
9. 25 bis 35 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Orbitalschüttler bei 400 bis 500 rpm inkubieren (möglichst lichtgeschützt).
10. Je 100 µl Stopplösung in alle Vertiefungen pipettieren.
11. Streifen im Mikrotiterplattenphotometer bei einer Meßwellenlänge von 450 nm (Referenzwellenlänge zwischen 570 und 650 nm) messen.

7.2.2

Normetanephrin-ELISA

Reagenzien auf Raumtemperatur bringen. Es empfiehlt sich, Doppelbestimmungen anzusetzen.

1. Je 20 μ l acylierte Standards 1 - 6, Kontrollen und Patientenproben in die entsprechenden Vertiefungen der Mikrotiterstreifen pipettieren.
2. Je 50 μ l Normetanephrin-Antiserum in alle Vertiefungen pipettieren.
3. Platte mit Folie abdecken und 15 bis 20 Stunden bei 2-8 $^{\circ}$ C inkubieren.
4. Vertiefungen entleeren, mit ca. 300 μ l verdünntem Waschpuffer füllen und wieder entleeren. Diesen Vorgang insgesamt 3 mal durchführen. Anschließend die Mikrotiterstreifen umgedreht auf eine saugfähige Unterlage (Papierhandtuch) legen und kurz ausklopfen, um alle Flüssigkeitsreste zu entfernen.
5. Je 100 μ l Enzym-Konjugat in alle Vertiefungen pipettieren.
6. 30 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Orbitalschüttler bei 400 bis 500 rpm inkubieren.
7. Waschen: Wie unter Punkt 4 beschrieben.
8. Je 100 μ l Substrat in alle Vertiefungen pipettieren.
9. 25 bis 35 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Orbitalschüttler bei 400 bis 500 rpm inkubieren (möglichst lichtgeschützt).
10. Je 100 μ l Stopplösung in alle Vertiefungen pipettieren.
11. Streifen im Mikrotiterplattenphotometer bei einer Meßwellenlänge von 450 nm (Referenzwellenlänge zwischen 570 und 650 nm) messen.

8. Auswertung

Die OD-Werte der Standards (linear) werden gegen die entsprechenden Konzentrationen der Standards (logarithmisch) aufgetragen. Die Konzentrationen der Patientenproben können dann direkt aus der Standardkurve in pg/ml abgelesen werden.

9. Testcharakteristika

9.1 Referenzbereiche

Die angegebenen Referenzbereiche gelten lediglich als Richtlinie. Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen Referenzbereiche erstellt.

| Metanephrin | Normetanephrin |
|--------------------|-----------------------|
| < 140 pg/ml | < 200 pg/ml |

9.2 Sensitivität

Die untere Nachweisgrenze wurde bestimmt, indem die 3-fache Standardabweichung der OD des Nullstandards gemessen und die entsprechende Konzentration an der Standardkurve abgelesen wurde.

| Metanephrin | Normetanephrin |
|--------------------|-----------------------|
| 10 pg/ml | 15 pg/ml |

9.3 Spezifität

Die in dem Test verwendeten Antikörper sind spezifisch für Normetanephrin und Metanephrin. Getestet wurden folgende Kreuzreaktivitäten.

| Substanz | Normetanephrin % | Metanephrin % |
|-------------------|------------------|---------------|
| Metanephrin | 0,010 | 100 |
| Normetanephrin | 100 | 0,102 |
| 3-Methoxytyramin | 0,024 | 0,002 |
| Adrenalin | 0,002 | 0,019 |
| Noradrenalin | 0,020 | <0,001 |
| Dopamin | 0,002 | <0,001 |
| L-Dopa | <0,001 | <0,001 |
| Tyramin | <0,001 | <0,001 |
| Tyrosin | <0,001 | <0,001 |
| Homovanillinsäure | <0,001 | <0,001 |
| Vanillinmandels. | <0,001 | <0,001 |

9.4. Wiederfindung

Unterschiedliche Mengen an **Metanephrin** wurden zu einer Plasma-
probe gegeben und anschließend im ELISA gemessen (Konzentrations-
angaben in pg/ml).

| zugesezt | gemessen | erwartet | % Wiederfindung |
|-------------------|----------|----------|-----------------|
| 0 | 57 | | |
| 10 | 61 | 67 | 91 |
| 20 | 75 | 77 | 97 |
| 30 | 78 | 87 | 90 |
| 50 | 107 | 107 | 100 |
| 75 | 117 | 132 | 89 |
| 100 | 145 | 157 | 92 |
| 200 | 237 | 257 | 92 |
| 400 | 444 | 457 | 97 |
| 600 | 537 | 657 | 81 |
| 800 | 864 | 857 | 101 |
| 1000 | 964 | 1057 | 91 |
| 1500 | 1524 | 1557 | 98 |
| 2500 | 2578 | 2557 | 101 |
| Mittelwert | | | 94 |

Unterschiedliche Mengen an **Normetanephrin** wurden zu einer Plasma-
probe gegeben und anschließend im ELISA gemessen (Konzentrations-
angaben in pg/ml).

| zugesezt | gemessen | erwartet | % Wiederfindung |
|-------------------|-----------------|-----------------|------------------------|
| 0 | 77 | | / |
| 10 | 92 | 87 | 106 |
| 20 | 99 | 97 | 102 |
| 30 | 99 | 107 | 93 |
| 50 | 131 | 127 | 103 |
| 75 | 151 | 152 | 99 |
| 100 | 186 | 177 | 105 |
| 200 | 286 | 277 | 103 |
| 400 | 478 | 477 | 100 |
| 600 | 556 | 677 | 82 |
| 800 | 783 | 877 | 89 |
| 1000 | 875 | 1077 | 81 |
| 1500 | 1297 | 1577 | 82 |
| Mittelwert | | | 95 |

9.5. Linearität

Die Linearität des ELISAs für **Metanephrin** wurde durch Verdünnen
einer aufgestockten Plasmaprobe mit Standard 1 bestimmt
(Konzentrationsangaben in pg/ml).

| Verdünnung | Messwert | extrapolierter Ausgangswert | Wiederfindung % |
|-------------------------------|-----------------|--|----------------------------|
| orig. | 3250 | 3250 | |
| 3 + 2 | 1941 | 3235 | 100 |
| 2 + 3 | 1296 | 3240 | 100 |
| 1 + 3 | 667 | 2668 | 82 |
| 1 + 5 | 486 | 2916 | 90 |
| 1 + 9 | 331 | 3310 | 102 |
| 1 + 15 | 204 | 3264 | 100 |
| 1 + 25 | 131 | 3406 | 105 |
| 1 + 40 | 85 | 3486 | 107 |
| mittlere Wiederfindung | | | 98 |

Die Linearität des ELISAs für **Normetanephrin** wurde durch Verdünnen einer aufgestockten Plasmaprobe mit Standard 1 bestimmt (Konzentrationsangaben in pg/ml).

| Verdünnung | Messwert | extrapolierter Ausgangswert | Wiederfindung % |
|-------------------------------|-----------------|------------------------------------|------------------------|
| orig. | 2965 | 2965 | |
| 3 + 2 | 1577 | 2628 | 89 |
| 2 + 3 | 1059 | 2648 | 89 |
| 1 + 3 | 706 | 2824 | 95 |
| 1 + 5 | 464 | 2784 | 94 |
| 1 + 9 | 317 | 3170 | 107 |
| 1 + 15 | 223 | 3568 | 120 |
| 1 + 25 | 110 | 2860 | 96 |
| 1 + 40 | 70 | 2870 | 97 |
| mittlere Wiederfindung | | | 98 |

9.6. Reproduzierbarkeit

Die Reproduzierbarkeit der ELISA-Methode wurde durch die Ermittlung der Intra-Assay-Variationskoeffizienten gezeigt (Konzentrationsangaben in pg/ml):

Intra-Assay Metanephrin

| Probe | Anzahl n | Mittelwert | SD | VK (%) |
|--------------|-----------------|-------------------|-----------|---------------|
| 1 | 40 | 52 | 4,9 | 9,4 |
| 2 | 40 | 270 | 17,4 | 6,5 |

Intra-Assay Normetanephrin

| Probe | Anzahl n | Mittelwert | SD | VK (%) |
|--------------|-----------------|-------------------|-----------|---------------|
| 1 | 40 | 65 | 5,5 | 8,4 |
| 2 | 40 | 263 | 11,8 | 4,5 |

10. Literatur

1. Plasma metanephrines: a novel and cost-effective test for pheochromocytoma.

Braz J Med Biol Res 2000 Oct;33(10):1157-69

Eisenhofer G, Walther M, Keiser HR, Lenders JW, Friberg P, Pacak K.
Clinical Neurocardiology Section, National Institute of Neurological Disorders and Stroke, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892-1620, USA. graeme@catecholamine.org

2. Plasma metanephrines in the diagnosis of pheochromocytoma

Ann Intern Med 1995 Jul 15; 123 (2): p101-9

Lenders JW; Keiser HR; Goldstein DS; Willemsen JJ; Friberg P; Jacobs MC; Kloppenborg PW; Thien T; Eisenhofer G
National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA.

Weitere Literatur auf Anfrage

Pipettierschema Probenvorbereitung (Normetanephrin und Metanephrin)

Präzipitation

| | Standards | Kontrollen | Proben |
|-----------------|-----------|------------|--------|
| Standard 1 – 6 | 400 µl | | |
| Kontrolle 1 & 2 | | 400 µl | |
| Patientenplasma | | | 400 µl |
| Präzipitator 1 | 50 µl | 50 µl | 50 µl |
| Präzipitator 2 | 50 µl | 50 µl | 50 µl |

gründlich mischen und 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
10 Minuten bei mind. 3.000 x g zentrifugieren
je 100 µl des Überstands für die Acylierung einsetzen

Acylierung

| | Standards | Kontrollen | Proben |
|--------------------|-----------|------------|--------|
| Standard 1 – 6 | 100 µl | | |
| Kontrolle 1 & 2 | | 100 µl | |
| Patientenplasma | | | 100 µl |
| Acylierungs-Puffer | 25 µl | 25 µl | 25 µl |

Acylierungs-Reagenz herstellen: Fläschchen in 2,5 ml Solvent lösen,
gründlich mischen und sofort einsetzen

| | | | |
|---------------|-------|-------|-------|
| AcyL.-Reagenz | 20 µl | 20 µl | 20 µl |
|---------------|-------|-------|-------|

60 Minuten bei RT auf einem Orbitalschüttler (400-500 rpm) inkubieren
Platte **nicht** abkleben oder zudeckeln, offen schütteln

Metanephrin **50 µl** Überstand für ELISA einsetzen
Normetanephrin **20 µl** Überstand für ELISA einsetzen

Pipettierschema ELISA (Metanephrin und Normetanephrin)

| | | |
|-----------|------------|--------|
| Standards | Kontrollen | Plasma |
|-----------|------------|--------|

Metanephrin

| | | | | |
|-----------------|----|----|----|----|
| Standard 1 - 6 | µl | 50 | | |
| Kontrolle 1 & 2 | µl | | 50 | |
| Patientenprobe | µl | | | 50 |
| Met. Antiserum | µl | 25 | 25 | 25 |

Normetanephrin

| | | | | |
|-------------------|----|----|----|----|
| Standard 1 - 6 | µl | 20 | | |
| Kontrolle 1&2 | µl | | 20 | |
| Patientenprobe | µl | | | 20 |
| Normet. Antiserum | µl | 50 | 50 | 50 |

Platte mit Folie abdecken und 15 bis 20 Stunden bei 2-8 °C inkubieren

3 x waschen

| | | | | |
|----------------|----|-----|-----|-----|
| Enzym-Konjugat | µl | 100 | 100 | 100 |
|----------------|----|-----|-----|-----|

30 Minuten bei RT auf Orbitalschüttler (400-500 rpm) inkubieren

3 x waschen

| | | | | |
|----------|----|-----|-----|-----|
| Substrat | µl | 100 | 100 | 100 |
|----------|----|-----|-----|-----|

25-35 Minuten bei RT auf Orbitalschüttler (400-500 rpm) inkubieren

| | | | | |
|-------------|----|-----|-----|-----|
| Stopplösung | µl | 100 | 100 | 100 |
|-------------|----|-----|-----|-----|

Messung der Extinktion bei 450 nm