




Arbeitsanleitung


Serotonin - ELISA

Enzymimmunoassay
für die quantitative Bestimmung von Serotonin
in Serum, Plasma, Urin und Liquor



REF EA602/96

 12 x 8

 2 – 8 °C

DLD Gesellschaft für Diagnostika und medizinische Geräte mbH
Adlerhorst 15 • 22459 Hamburg • Tel 040-555 87 10 • Fax 040-555 87 111
Internet: <http://www.dld-diagnostika.de> • E-Mail: contact@dld-diagnostika.de

April 2009

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung und Testprinzip	Seite	4
2.	Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen	Seite	5
3.	Lagerung und Haltbarkeit	Seite	5
4.	Inhalt des Testbestecks	Seite	5
5.	Probengewinnung	Seite	7
6.	Vorbereitung der Reagenzien und Proben	Seite	8
7.	Testdurchführung ELISA	Seite	9
8.	Auswertung und Beurteilung	Seite	10
9.	Testcharakteristika	Seite	11
10.	Literatur	Seite	15
	Pipettierschema	Seite	16

1. Einleitung und Testprinzip

Serotonin (5-Hydroxytryptamin) gehört in die Gruppe der biogenen Amine und ist ein Intermediärprodukt des Tryptophanstoffwechsels. Es ist ein gut dokumentierter Neurotransmitter des zentralen Nervensystems und ist in hohen Konzentrationen in den chromaffinen Zellen der Darmschleimhaut, in den Thrombozyten und den serotonergen Neuronen des Gehirns nachweisbar.

Zentral-serotonerge Neuronen beeinflussen physiologische Funktionen wie z. B. den Schlaf sowie die hormonelle und kardio-vaskuläre Regulation. Erhöhte Serumspiegel werden bei malignem Karzinoid, bei endogener Depression und Schizophrenie beobachtet. Serotonin ist ein spezifischer Tumormarker für das maligne Karzinoid.

Der Serotonin-ELISA-Kit enthält Reagenzien für die quantitative Bestimmung von derivatisiertem Serotonin (5-Hydroxytryptamin) in Serum, Plasma, Urin und Liquor. Die Derivatisierung erfolgt während der Probenvorbereitung. Dabei wird Serotonin durch das Acylierungsreagenz quantitativ in N-Acylserotonin umgewandelt.

Der Serotonin-ELISA ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay. An die Festphase gebundenes und freies, in Lösung befindliches Antigen 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 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 des Antigens in der Probe.

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 und Schutzbrille tragen.
- 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

Der Kit ist bei Lagerung zwischen 2 - 8 °C bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar. Nach Anbruch ist der Kit bis zum Verfallsdatum haltbar. Zur Haltbarkeit der gebrauchsfertigen Reagenzien siehe Vorbereitung der Reagenzien.

Alle Reagenzien müssen vor ihrer Verwendung auf Raumtemperatur gebracht und sofort nach Gebrauch wieder kühl gestellt werden.

4. Inhalt des Testbestecks

- 4.1 **MT-Streifen** **STRIPS** 12 Stück
Mikrotiterstreifen mit je 8 Vertiefungen,
einzeln abbrechbar, beschichtet mit Serotonin
- 4.2 **Standards 1 - 6** **CAL 1-6** 6 Fläschchen
Je 4 ml, gebrauchsfertig

Konzentrationen:

Standard	1	2	3	4	5	6
ng/ml	0	15	50	150	500	2.500

4.3	Kontrolle 1 & 2 Je 4 ml, gebrauchsfertig Bereich: Siehe Q.C.-Zertifikat im Kit	CON 1 & 2	2 Fläschchen
4.4	Acylierungspuffer 3,5 ml, gebrauchsfertig	ACYL-BUFF	1 Fläschchen
4.5	Acylierungsreagenz 3 ml, gebrauchsfertig	ACYL-REAG	1 Fläschchen
4.6	Antiserum 5,5 ml, gebrauchsfertig, blau gefärbt Kaninchen-anti-N-Acylserotonin	AS	1 Fläschchen
4.7	Enzymkonjugat 11 ml, gebrauchsfertig Anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase	CONJ	1 Fläschchen
4.8	Waschpuffer 20 ml, Konzentrat Inhalt mit bidest. Wasser auf 500 ml auffüllen.	WASH 25x	1 Fläschchen
4.9	Substrat 12 ml TMB-Lösung, gebrauchsfertig	SUB	1 Fläschchen
4.10	Stopplösung 12 ml, gebrauchsfertig Enthält 0,3 M Schwefelsäure	STOP	1 Fläschchen
4.11	Reaktionsplatte für die Acylierung	ACYL-PLATE	1 Stück
4.12	Ausgleichsreagenz lyophilisiert, mit 20 ml dest. Wasser lösen vorsichtig mischen, übermäßige Schaumbildung vermeiden	EQUA-REAG	1 Fläschchen
4.13	Haftklebefolie	FOIL	1 Stück

Weiter werden benötigt (nicht im Kit enthalten):

- Pipetten für 10, 25, 50, 100 und 200 µl
- Mehrkanalpipette oder Waschgerät
- Photometer für die Auswertung von Mikrotiterplatten (450 nm)

5. Probengewinnung

5.1. Serum und Plasma

Für den Test kann sowohl Serum als auch EDTA-Plasma und Heparin-Plasma eingesetzt werden.

Wenn Plasma verwendet wird ist es besonders wichtig, daß die Probe frei von Thrombozyten ist. Ansonsten muß die Serotonin-Konzentration auf die Anzahl der Thrombozyten in der Probe bezogen werden. Da die Herstellung plättchenfreien Plasmas spezielle Vorsichtsmaßnahmen erfordert, empfehlen wir Serum statt Plasma zu verwenden.

Hämolytische und insbesondere lipämische Proben sollten im Assay nicht eingesetzt werden.

Die Proben können bis zu 24 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.

Wiederholtes Einfrieren und Wiederauftauen sollte vermieden werden.

5.2. Urin

Es kann sowohl Spontanurin als auch Sammelurin verwendet werden.

Sammelurin: Der gesamte Urin, der während einer Periode von 24 Stunden ausgeschieden wird, wird in einem Behälter, der 10 - 15 ml 6 N Salzsäure als Konservierungsmittel enthält, gesammelt. Direktes Sonnenlicht sollte vermieden werden. Das Gesamtvolumen wird bestimmt und ein Aliquot für die Messung entnommen. Bei Verdacht auf eine Nierenfunktionsstörung sollte auch eine Kreatininbestimmung durchgeführt werden. Urinproben, die nicht sofort in dem Test eingesetzt werden, können bei -20 °C mindestens 6 Monate gelagert werden.

6. Vorbereitung der Reagenzien und Proben

6.1 MT-Streifen **STRIPS**

Mikrotiterstreifen im geschlossenen Folienbeutel in etwa 10 Minuten auf Raumtemperatur bringen. Die nicht benötigten Mikrotiterstreifen dem Halterahmen entnehmen, wieder in den Beutel legen (das Trockenmittel im Beutel belassen) und diesen **sorgfältig** verschließen.

6.2 Waschpuffer **WASH**

Inhalt des Fläschchens mit destilliertem Wasser auf 500 ml auffüllen. Der fertige Waschpuffer muss für den späteren Gebrauch bei 2 - 8 °C gelagert werden und bleibt so für 4 Wochen verwendbar.

6.3 Ausgleichsreagenz **EQUA-REAG**

Inhalt des Fläschchens in 20 ml destilliertem Wasser lösen, kurz mischen und 30 min auf den Rollmischer legen. Vorsichtig mischen, übermäßige Schaumbildung vermeiden.

Das gelöste Ausgleichsreagenz muss für den späteren Gebrauch bei -20 °C eingefroren werden und bleibt so für mind. 1 Jahr verwendbar.

Alle anderen Reagenzien sind gebrauchsfertig.

6.4. Probenvorbereitung (Acylierung)

Die für die Acylierung verwendeten Vertiefungen der Reaktionsplatte markieren (Edding) und nicht noch einmal verwenden!

1. Je **10 µl Standard 1 - 6**, je **10 µl Kontrolle 1 & 2**, je **10 µl Serum** (oder **10 µl Urin** oder **25 µl Plasma** oder **50 µl Liquor**) in die jeweiligen Vertiefungen der im Kit enthaltenen Reaktionsplatte pipettieren.
2. Je **25 µl Acylierungspuffer** in alle Vertiefungen pipettieren.
3. Je **200 µl Ausgleichsreagenz** in alle Vertiefungen pipettieren.
4. Je **25 µl Acylierungsreagenz** in alle Vertiefungen pipettieren und **sofort** mischen.
5. Reaktionsplatte 30 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler inkubieren.

Je 20 µl der so vorbereiteten Proben werden in den Serotonin-ELISA eingesetzt.

7. Testdurchführung ELISA

Die Reagenzien auf Raumtemperatur bringen und sorgfältig mischen, Schaumbildung vermeiden.

7.1 Proben-Inkubation

Jeweils **20 µl vorbereitete Standards 1 bis 6**, **20 µl der vorbereiteten Kontrollen** und **20 µl der vorbereiteten Proben** (vorzugsweise als Doppelbestimmungen) in die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen pipettieren.

Je **50 µl Antiserum** in alle Vertiefungen pipettieren.

Platte mit der Haftklebefolie abdecken und 60 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler inkubieren.

7.2 Waschen

Vertiefungen entleeren, mit ca. **250 µl Waschpuffer** füllen und wieder entleeren. Anschließend die Mikrotiterstreifen umgedreht auf eine saugfähige Unterlage (Papierhandtuch) legen und kurz ausklopfen, um alle Flüssigkeitsreste zu entfernen. Diesen Vorgang insgesamt 3 - 4 mal durchführen.

7.3 Konjugat-Inkubation

Jeweils **100 µl Enzymkonjugat** in die Vertiefungen pipettieren. 30 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler inkubieren.

7.4 Waschen

Wie unter Punkt 7.2 beschrieben.

7.5 Substrat-Inkubation

Jeweils **100 µl Substrat** in die Vertiefungen pipettieren und 20 bis 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren (unter Schütteln).

7.6 Stoppen der Substrat-Inkubation

Jeweils **100 µl Stopplösung** in die Vertiefungen pipettieren; dabei die gleiche Reihenfolge und den gleichen Zeittakt einhalten wie bei Zugabe der Substratlösung.

7.7 Messung

Streifen im Mikrotiterplattenphotometer bei einer Meßwellenlänge von 450 nm (Referenzwellenlänge zwischen 570 nm und 650 nm) messen.

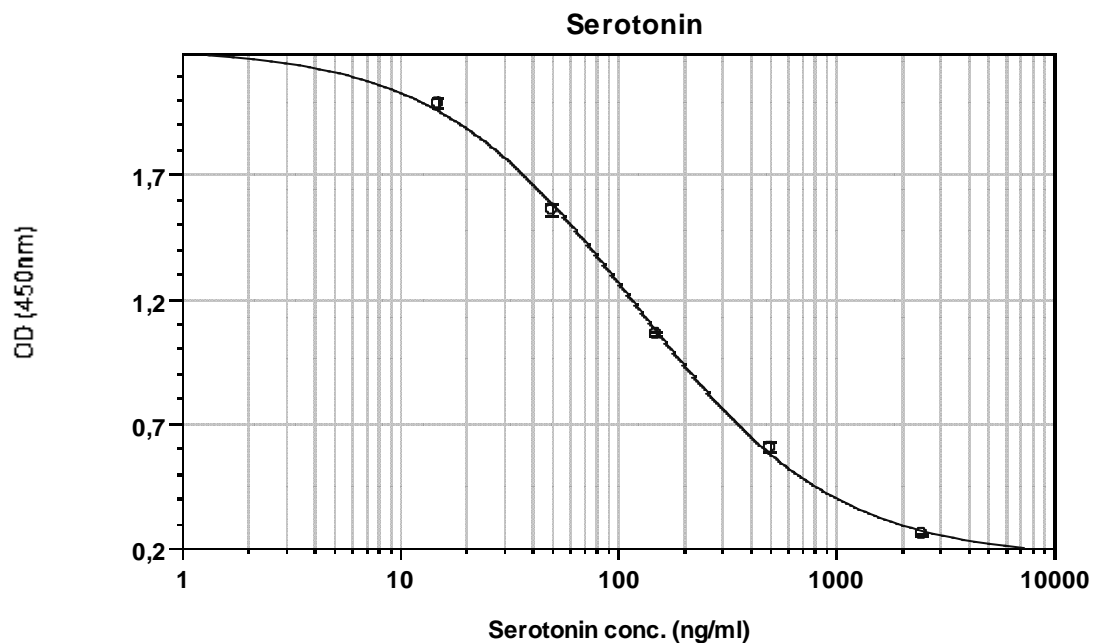
8. Auswertung und Beurteilung

Die OD-Werte der Standards (linear) werden gegen die entsprechenden Konzentrationen der Standards (logarithmisch) aufgetragen. Die Konzentrationen der Kontrollen, Urin- und Serumproben können dann direkt aus der Eichkurve in ng/ml abgelesen werden.

Die abgelesenen Werte für die Plasma-Proben müssen durch den Faktor 2,4 geteilt werden.

Die abgelesenen Werte für die Liquor-Proben müssen durch den Faktor 4,3 geteilt werden.

Die folgende Abbildung zeigt ein typisches Beispiel einer Standardkurve.



$$y = (A - D) / (1 + (x/C)^B) + D$$

	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>D</u>	<u>R²</u>
□ Std (Standards: Concentration vs MeanValue)	2,205	0,947	119,181	0,159	0,999

9. Testcharakteristika

Referenzbereiche

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

Plasma (thrombozytenfrei) : < 10 ng/ml

Serum: Frauen 80 - 450 ng/ml
Männer 40 - 400 ng/ml

Urin: 50 - 250 µg/Tag

Sensitivität

5 ng/ml

Spezifität (Kreuzreaktivitäten)

Der in dem Test verwendete Antikörper ist spezifisch für Serotonin. Getestet wurden die Kreuzreaktivitäten zu Tryptamin, Melatonin, 5-HIAA, 5-Methoxytryptamin, L-Tryptophan.

Substanz	ED-50-Wert (ng/ml)	Kreuzreaktivität (%)
Serotonin	131	100
Tryptamin	10049	1,3
5-Methoxytryptamin	73950	0,18
Melatonin	> 1.000.000	< 0,013
5-HIAA	> 1.000.000	< 0,013
L-Tryptophan	> 1.000.000	< 0,013

Wiederfindung

Unterschiedliche Mengen an Serotonin wurden zu einer Serum und einer Urinprobe gegeben und anschließend im ELISA gemessen. Die analytische Wiederfindung von Serotonin wurde bei verschiedenen Konzentrationen aus den theoretisch erwarteten und den praktisch gemessenen Werten ermittelt. Die mittlere Wiederfindungen für alle unten aufgelisteten Konzentrationen der Serum- und der Urinprobe betragen jeweils 107%. (Konzentrationsangaben in ng/ml)

Serum:

zugesezt	gemessen	erwartet	% Wiederfindung
0	47,4		
19,6	65,3	67,0	97
38,5	94,4	85,9	110
68,4	134	116	116
96,8	160	144	111
125	205	172	119
152	220	199	110
188	235	235	100
244	322	291	111
310	418	357	117
385	456	432	105
476	481	523	92
684	729	731	100
874	932	921	101
Mittelwert			107

Urin:

zugesezt	gemessen	erwartet	% Wiederfindung
0	86,4		
19,6	99,7	106	94
38,5	137	125	110
68,4	174	155	112
96,8	200	183	109
125	208	211	98
152	261	238	109
188	294	274	107
244	370	330	112
310	406	396	102
385	516	471	109
476	645	562	115
684	845	770	110
874	985	960	103
Mittelwert			107

Linearität

Die Linearität des ELISAs wurde durch Verdünnen einer aufgestockten Serum- bzw. Urinprobe bestimmt. Die mittlere Linearität aller Verdünnungen betrug für die Serumprobe 103% und für die Urinprobe ebenfalls 103%.

Konzentrationsangaben in ng/ml

Serum:

Verdünnung	Messwert	extrapolierter Ausgangswert	Wiederfindung %
orig.	1077		
4 + 1	903	862	105
2 + 1	721	718	100
1 + 1	519	539	96
1 + 2	363	359	101
1 + 3	296	269	110
1 + 4	210	215	97
1 + 6	145	154	94
1 + 9	117	108	109
1 + 14	77,7	71,8	108
1 + 19	57,5	53,9	107

mittlere Linearität

103

Urin:

Verdünnung	Messwert	extrapolierter Ausgangswert	Wiederfindung %
orig.	1121		
4 + 1	842	897	94
2 + 1	812	747	109
1 + 1	585	561	104
1 + 2	391	374	105
1 + 3	277	280	99
1 + 4	196	224	87
1 + 6	165	160	103
1 + 9	123	112	110
1 + 14	89,7	74,7	120

mittlere Linearität

103

Reproduzierbarkeit

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

Intra-Assay

Serum:

Probe	Anzahl n	Mittelwert	SD	VK (%)
1	41	133	8,0	6,0
2	41	366	17,4	4,7

Urin:

Probe	Anzahl n	Mittelwert	SD	VK (%)
1	40	128	8,4	6,6
2	40	308	16,6	5,4

10. Literatur

- Harenberg, J., Huhle, G., Giese, Ch., Wang, L., Feuring, M., Song, X., Hofmann, U.
Determination of serotonin release from platelets by enzyme immunoassay in the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia
British Journal of Hematology, **109**, 182-186 (2000)
- Balaskas, E., Bamihas, G., Karamouzis, M., Voyiatzis, G., Tourkantonis, A.
Histamine and Serotonin in uremic pruritus: effect of ondansetron in CAPD-pruritic patients
Nephron, **78:395-402** (1998)
- Stratz, T., Samborski, W., Hrycaj, P., Pap, T., Mackiewicz, S., Mennet, P., Müller, W.
Die Serotoninkonzentration im Serum bei Patienten mit generalisierter Tendomyopathie (Fibromyalgie) und chronischer Polyarthritits
Medizinische Klinik, **88**, 458-462 (1993)
- Manz, B. et al.
Radioimmunoassay of human serum serotonin
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. **23**, (1985), 657
- Manz, B., Kosfeld H., Belovsky, O., Grill H.-J., Pollow, K.
Direkte radioimmunologische Bestimmung des Serotonins in normalen und pathologischen Seren
Ärztl. Lab. **32** (1986), 135 - 140
- Attanasio, A. et al.
Diurnal rhythms of N-acetylserotonin and serotonin
J. Pineal res. **3** (1986), 251 - 256
- Manz, B., Raynaud, F. and Pevet, P.
Direct radioimmunoassay of N-acetylserotonin and serotonin in the pineal gland of rat and hamster
In: EPSG Newsletter Suppl. 7, Ares Serono Symposia, I. Colloquium of the european pineal study group (1987) p.92
- Kema, I.P. et al.
Influence of a Serotonin- and Dopamine-Rich Diet on Platelet Serotonin Content and Urinary Excretion of Biogenic Amines and Their Metabolites
Clin. Chem. **38/9** (1992), p.1730 – 1736
- Manz, B. et al.
Radioimmunoassay of human serum serotonin
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. **23**, (1985), 657
- Kema, I.P. et al.
Improved Diagnosis of Carcinoid Tumors by Measurement of Platelet Serotonin
Clin. Chem. **38/4** (1992), p. 534 - 540

Pipettierschema

Probenvorbereitung

		Standards	Kontrolle	Serum, Urin	Plasma	Liquor
Standard 1- 6	µl	10				
Kontrolle 1 & 2	µl		10			
Serum, Urin	µl			10		
Plasma	µl				25	
Liquor	µl					50
Acyl. Puffer	µl	25	25	25	25	25
Ausgleichsreagenz	µl	200	200	200	200	200
Acyl. Reagenz	µl	25	25	25	25	25

30 Minuten bei Raumtemperatur schütteln

Pipettierschema ELISA

		Standard	Kontrolle	Patienten- Proben
Standard 1-6	µl	20		
Kontrolle 1 & 2	µl		20	
Patientenprobe	µl			20
Antiserum	µl	50	50	50

60 Minuten bei Raumtemperatur schütteln

3 - 4 x Waschen

Enzymkonjugat	µl	100	100	100
---------------	----	-----	-----	-----

30 Minuten bei Raumtemperatur schütteln

3 - 4 x Waschen

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

20 - 30 Minuten bei Raumtemperatur schütteln

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

Messung der Extinktion bei 450 nm