



## Gebrauchsanweisung

# Dopamine High Sensitive ELISA


(Hochsensitiv und für kleine Probenvolumina)


Enzymimmunoassay für die  
Quantitative Bestimmung von  
**Dopamin**

**RUO**

Nur für Forschungszwecke

**REF** EA634/96

 12 x 8

 2 – 8 °C












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

## Inhaltsverzeichnis

1	Einführung und Testprinzip .....	3
2	Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen.....	4
3	Lagerung und Haltbarkeit.....	4
4	Inhalt des Kits.....	5
5	Probengewinnung und -lagerung.....	8
6	Vorbereitung der Reagenzien und Proben .....	10
7	Testdurchführung ELISA .....	13
8	Auswertung .....	14
9	Testcharakteristika.....	16
10	Änderungen .....	17
	Pipettierschema – Probenvorbereitung .....	18
	Pipettierschema – ELISA.....	20

## Verwendete Symbole

	Forschungszwecke		
	Inhalt		Verwendbar bis
	Chargenbezeichnung		Temperaturbegrenzung
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Bestellnummer		Gebrauchsanweisung beachten

## Gefahrensymbole



Gefahr



Achtung

## 1 Einführung und Testprinzip

Der Dopamine High Sensitive ELISA-Kit enthält Reagenzien für die quantitative Bestimmung von Dopamin in niedrigkonzentrierten Proben bzw. für kleine Probenvolumina.

Dopamin wird mittels eines cis-Diol-spezifischen Boronat-Affinitätsgels extrahiert, acyliert und anschließend enzymatisch in N-Acyl-3-Methoxytyramin umgewandelt.

Der Dopamine High Sensitive ELISA ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay. Dopamin ist an die Festphase der Mikrotiterplatte gebunden. Acyliertes Dopamin aus der Probe und an die Festphase gebundenes Dopamin 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 des Dopamins in der Probe.

## 2 Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

- Nur für Forschungszwecke. Nur für den Gebrauch durch Fachpersonal.
- 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.
- Während der Testdurchführung Kittel, Einmal-Handschuhe und Schutzbrille tragen.
- Einige Komponenten dieses Testbestecks enthalten Gefahrstoffe und sind entsprechend gekennzeichnet. Weitere Informationen befinden sich im Sicherheitsdatenblatt.
- Kontakt mit einzelnen Reagenzien vermeiden, diese können Reizungen und Verätzungen verursachen.
- Abfälle sollten nach den staatlichen und örtlichen Umweltschutzregularien entsorgt werden.

## 3 Lagerung und Haltbarkeit

Der Kit ist bei Lagerung zwischen 2 – 8 °C bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar. Zur Haltbarkeit der vorbereiteten Reagenzien siehe 6.1 Vorbereitung der Reagenzien.

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

Einzelne Komponenten verschiedener Chargen sollten nicht ausgetauscht werden.

## 4 Inhalt des Kits

### 4.1 Reagenzien für die Probenvorbereitung

#### Extraktionsplatte

EX-PLATE

2 Stück

48 Vertiefungen

Beschichtet mit Boronat-Affinitätsgel

#### Extraktionspuffer

EX-BUFF

2 Fläschchen

6 ml, gebrauchsfertig

violett gefärbt

#### Salzsäure

HCL

1 Fläschchen

21 ml, gebrauchsfertig

0,025 M HCl

Gelb/orange gefärbt

#### Standards (A - F)

CAL A - F

6 Fläschchen

Je 4 ml, gebrauchsfertig

Konzentrationen:

Standard	A	B	C	D	E	F
Dopamin (ng/ml)	0	0,3	1,25	5	20	100
Dopamin (nmol/l)	0	2,0	8,2	32,7	131	653

#### Kontrolle 1 & 2

CON 1 &amp; 2

2 Fläschchen

Je 4 ml gebrauchsfertig

Konzentrationen: siehe Q.C.-Zertifikat

#### Acylierungs-Reagenz

ACYL-REAG

1 Fläschchen



6 ml, gebrauchsfertig

Enthält DMSO und DMF

Bitte beachten: Lösungsmittel reagieren mit vielen Plastikmaterialien, z.B. Plastikschrälchen. Sie reagieren nicht mit normalen Pipettenspitzen und Glasgefäßen.



Gefahr  
Achtung

<b>Acylierungs-Puffer</b> 20 ml, gebrauchsfertig, Violett gefärbt	<b>ACYL-BUFF</b>	1 Fläschchen
<b>Enzym</b> Je 2 ml, lyophilisiert, Catechol-O-Methyltransferase	<b>ENZYME</b>	3 Fläschchen
<b>Coenzym</b> 1 ml, gebrauchsfertig, S-Adenosyl-L-Methionin	<b>COENZYME</b>	1 Fläschchen
<b>Enzym-Puffer</b> 3,5 ml, gebrauchsfertig	<b>ENZYME-BUFF</b>	1 Fläschchen  Achtung
<b>Enzymplatte</b> 96 Vertiefungen	<b>ENZYME-PLATE</b>	1 Stück
<b>Proben-Stabilisator</b> 20 ml, gebrauchsfertig	<b>STABILIZER</b>	1 Fläschchen  Achtung

## 4.2 Reagenzien für den ELISA

<b>Dopamin-Antiserum</b> 2,5 ml, gebrauchsfertig, vom Kaninchen grün gefärbt	<b>AS-DA</b>	1 Fläschchen
<b>MT-Streifen</b> Mikrotiterstreifen mit je 8 Kavitäten, einzeln abbrechbar Vorbeschichtet mit: Dopamin	<b>STRIPS-DA</b>	12 Stück
<b>POD Konjugat</b> 12 ml, gebrauchsfertig Anti-Kaninchen IgG-POD Konjugat	<b>CONJ</b>	1 Fläschchen
<b>Waschpuffer</b> 20 ml, Konzentrat Inhalt mit bidest. Wasser auf 500 ml auffüllen	<b>WASH</b>	2 Fläschchen
<b>Substrat</b> 12 ml TMB Lösung, gebrauchsfertig	<b>SUB</b>	1 Fläschchen
<b>Stopplösung</b> 12 ml, gebrauchsfertig Enthält 0,3M Schwefelsäure	<b>STOP</b>	1 Fläschchen
<b>Haftklebefolie</b> gebrauchsfertig	<b>FOIL</b>	10 Stück

Weiter werden benötigt (nicht im Kit enthalten)

- Pipetten für 20, 50, 100, 150, 175, 280 µl
- Multipetten für 20, 25, 50, 100, 150, 1000µl
- Schüttler (horizontal)
- Mehrkanalpipette oder Waschgerät
- Photometer für die Messung von Mikrotiterplatten
- Destilliertes Wasser
- Evtl. Wärmeschrank (37 °C)

## 5 Probengewinnung und -lagerung

### 5.1 Plasma

Für den Test kann 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 insbesondere lipämische Plasmen sollten im Assay nicht eingesetzt werden, da sie zu falsch niedrigen Werten führen können.

Das Plasma muss unmittelbar nach der Gewinnung zentrifugiert (möglichst bei 2 - 8 °C) und sofort eingefroren werden und bleibt bei -20 °C bis zu 1 Woche stabil.

Zur Verbesserung der Stabilität sollte jede Plasmaprobe vor dem Einfrieren mit dem mitgelieferten Proben-Stabilisator **STABILIZER** angereichert werden (20% des Probenvolumens), z.B.:

Probenvolumen	+ Stabilisatorvolumen	= Totalvolumen
20 µl	4 µl	24 µl
50 µl	10 µl	60 µl
100 µl	20 µl	120 µl
200 µl	40 µl	240 µl
300 µl	60 µl	360 µl
500 µl	100 µl	600 µl

Auf Grund des 20%igen-Zusatzes muss die ermittelte Konzentration der Probe mit dem Faktor 1,2 multipliziert werden.

### 5.2 Zellkulturproben und allgemein biologische Proben

Die Lagerung und Stabilität dieser Proben ist vom Probentyp und der Gewinnung abhängig. Daher kann nur ein allgemeiner Hinweis, ohne Gewähr für den jeweiligen Einzelfall, gegeben werden:

Die Proben müssen unmittelbar nach der Gewinnung eingefroren werden und bleiben bei -20 °C bis zu 1 Woche stabil.



Zur Verbesserung der Stabilität sollte jede Probe vor dem Einfrieren mit dem mitgelieferten Proben-Stabilisator **STABILIZER** angereichert werden (10% des Probenvolumens), z.B.:

Probenvolumen	+ Stabilisatorvolumen	= Totalvolumen
20 µl	2 µl	22 µl
50 µl	5 µl	55 µl
100 µl	10 µl	110 µl
200 µl	20 µl	220 µl
300 µl	30 µl	330 µl
500 µl	50 µl	550 µl

Auf Grund des 10%igen-Zusatzes muss die ermittelte Konzentration der Probe mit dem Faktor 1,1 multipliziert werden.

Angesäuerte Proben, die bereits einen pH-Wert  $\leq 5$  besitzen dürfen nicht zusätzlich mit dem Proben-Stabilisator angereichert werden und müssen unmittelbar nach der Gewinnung eingefroren werden.

### 5.3 Gewebehomogenate

Gewebhomogenate können in 1:20 verdünntem Proben-Stabilisator **STABILIZER** (z.B.: 19 ml dest. Wasser + 1 ml Proben-Stabilisator) homogenisiert werden.

Weitere Grundsätze für die Probengewinnung müssen berücksichtigt werden:

- Vermeidung zu hoher Säurekonzentrationen in der Probe, da diese die Pufferkapazität des Extraktionspuffers übersteigen könnten. Während des ersten Schrittes der Extraktion muss ein pH-Wert  $\geq 7$  eingehalten werden. Dieses kann ggf. auch durch schrittweise Zugabe von zusätzlichem Extraktions-Puffer ausgeglichen werden (50 µl-Schritte).

Angesäuerte Proben, die bereits einen pH-Wert  $\leq 5$  besitzen dürfen nicht zusätzlich mit dem Proben-Stabilisator angereichert werden.

- Vermeidung von Substanzen in der Probe mit cis-diol-Struktur (z.B.: Borsäure, Sorbitol, Mannitol). Diese verringern die Extraktionsausbeute und führen zu falsch niedrigen Werten.

## 6 Vorbereitung der Reagenzien und Proben

### 6.1 Vorbereitung der Reagenzien

#### 6.1.1 Waschpuffer

Inhalt eines Fläschchens **WASH** mit destilliertem Wasser auf 500 ml auffüllen.

Der verdünnte Waschpuffer muss für den späteren Gebrauch bei 2 – 8 °C gelagert werden und bleibt so für 4 Wochen verwendbar.

#### 6.1.2 Enzymmix

ACHTUNG: Der Enzymmix darf erst 10 - 15 Minuten vor Gebrauch angesetzt werden. Nach Gebrauch ist das Restreagenz zu verwerfen.

Inhalt eines Fläschchens **ENZYME** mit 2 ml destilliertem Wasser auflösen. Anschließend 0,3 ml **COENZYME** und 0,7 ml **ENZYME-BUFF** dazu pipettieren (Endvolumen 3 ml) und gut mischen.

Durch die drei Fläschchen Enzym im Kit ist der ELISA in drei Ansätzen teilbar. Falls der Kit in einem Ansatz komplett verbraucht werden soll, ist die Verwendung eines Fläschchens ausreichend.

Alle anderen Reagenzien sind gebrauchsfertig.

## 6.2 Probenvorbereitung

Alle Reagenzien auf Raumtemperatur bringen. Es wird empfohlen Doppelbestimmungen durchzuführen. Es werden je 20 µl der Standards und Kontrollen extrahiert und je 1 - 300 µl Probe (alternativ auch > 300 µl bis 500 µl)

1. Je 20 µl Standard A – F **CAL A – F**, je 20 µl Kontrolle 1 & 2 **CON 1 &2** und je 1 - 300 µl Probe in die entsprechende Vertiefung der Extraktionsplatte **EX-PLATE** pipettieren.

Innerhalb eines Testansatzes muss in allen Vertiefungen das gleiche Endvolumen vorherrschen: 300 µl oder 500 µl.

Zum Volumenausgleich:

Je 280 µl destilliertes Wasser zu den Standards und Kontrollen pipettieren (Endvolumen: 300 µl). Proben mit destilliertem Wasser auf 300 µl auffüllen, z.B. 100 µl Probe + 200 µl destilliertes Wasser.

Bei Probenvolumina > 300 µl bis 500 µl sind die Vertiefungen mit den Standards, Kontrollen und ggf. Proben auf 500 µl mit destilliertem Wasser aufzufüllen.

2. Je 100 µl Extraktions-Puffer **EX-BUFF** in jede Vertiefung pipettieren.
3. Platte mit Haftklebefolie **FOIL** abdecken und 60 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler bei hoher Schüttelfrequenz mischen.
4. Die Platte ausleeren und Flüssigkeitsreste durch kräftiges Ausklopfen auf einem saugfähigen Papierhandtuch entfernen.
5. Je 1 ml Waschpuffer **WASH** in alle Vertiefungen pipettieren und 5 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler bei niedriger Schüttelfrequenz mischen.
6. Die Platte ausleeren und Flüssigkeitsreste durch kräftiges Ausklopfen auf einem saugfähigen Papierhandtuch entfernen.
7. Je 150 µl Acylierungs-Puffer **ACYL-BUFF** in jede Vertiefung pipettieren.
8. Je 50 µl Acylierungs-Reagenz **ACYL-REAG** in jede Vertiefung pipettieren und sofort mit Punkt 9. fortfahren.  
Bitte beachten: Lösungsmittel reagieren mit vielen Plastikmaterialien, z.B. Plastikschrälchen. Sie reagieren nicht mit normalen Pipetten-spitzen und Glasgefäßen.
9. 20 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.

10. Die Platte ausleeren und Flüssigkeitsreste durch kräftiges Ausklopfen auf einem saugfähigen Papierhandtuch entfernen.
11. Je 1 ml Waschpuffer **WASH** in alle Vertiefungen pipettieren und 5 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler bei niedriger Schüttelfrequenz mischen.
12. Die Platte ausleeren und Flüssigkeitsreste durch kräftiges Ausklopfen auf einem saugfähigen Papierhandtuch entfernen.
13. Waschvorgang aus Punkt 11. und 12. einmal wiederholen.
14. Je 125 µl Salzsäure **HCL** zur Elution des Dopamins in jede Vertiefung pipettieren.
15. Platte mit Haftklebefolie abdecken und 20 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.  
Vorsicht: Überstand anschließend nicht ausleeren!
16. Je 100 µl von der Extraktionsplatte **EX-PLATE** in die entsprechenden Vertiefungen der Enzymplatte **ENZYM-PLATE** übertragen.  
(Die angebrochene Extraktionsplatte nicht werfen, sondern für den zweiten und dritten Testansatz mit einer Folie versiegelt, aufbewahren)
17. Je 20 µl des frisch vorbereiteten Enzymmixes (s. 6.1.2) in jede Vertiefung der Enzymplatte pipettieren. Die Farbe in der Vertiefung wechselt zu rot.
18. Enzymplatte mit Haftklebefolie **FOIL** abdecken und 1 Minute bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
19. Enzymplatte 90 Minuten bei 37 °C ohne Schütteln inkubieren. (Alternativ: 120 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.)  
Vorsicht: Überstand anschließend nicht ausleeren!

## 7 Testdurchführung ELISA

1. Je 100 µl vorbereitete Standards, Kontrollen und Proben von der Enzymplatte **ENZYM-PLATE** in die entsprechenden Vertiefungen der Mikrotiterstreifen **STRIPS-DA** übertragen.  
(Die angebrochene Enzymplatte nicht verwerfen, sondern für den zweiten und dritten Testansatz mit einer Haftklebefolie versiegelt, aufbewahren)
2. Je 20 µl Dopamin-Antiserum **AS-DA** (grün gefärbt) in jede Vertiefung der Mikrotiterstreifen pipettieren.
3. Platte mit Haftklebefolie **FOIL** abdecken. Kurz auf dem Horizontalschüttler mischen und 15 - 20 Stunden (über Nacht) bei 2 – 6 °C inkubieren.
4. Vertiefungen entleeren, mit ca. 250 µl Waschpuffer **WASH** füllen und wieder entleeren. Anschließend die Mikrotiterstreifen umgedreht auf ein saugfähiges Papierhandtuch legen und kurz ausklopfen, um alle Flüssigkeitsreste zu entfernen. Diesen Vorgang 3 x wiederholen.
5. Je 100 µl POD-Konjugat **CONJ** in jede Vertiefung pipettieren.
6. 60 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
7. Waschen: wie unter Punkt 4. beschrieben.
8. Je 100 µl Substrat **SUB** in jede Vertiefung pipettieren.
9. 35 bis 45 Minuten bei Raumtemperatur (20 – 25 °C) auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
10. Je 100 µl Stopplösung **STOP** in jede Vertiefung pipettieren.
11. Streifen im Mikrotiterplattenphotometer bei einer Messwellenlänge von 450 nm innerhalb 15 Minuten (Referenzwellenlänge zwischen 570 nm und 650 nm) messen.

## 8 Auswertung

Die OD-Werte der Standards (linear) werden gegen die entsprechenden Konzentrationen der Standards (logarithmisch) aufgetragen.

Bei Verwendung eines Computerprogramms wird die 4-Parameter-Analyse empfohlen. Alternativ kann auch die Cubic-Spline-Methode oder die Logit-Log-Berechnung verwendet werden.

Die aus der Standardkurve abgelesenen Konzentrationen der Kontrollen können ohne weitere Umrechnung übernommen werden.

Auf Grund der unterschiedlich eingesetzten Volumina an Probe (1 – 300 µl) und Standard (20 µl) müssen die abgelesenen Konzentrationen der Proben durch einen Volumenfaktor geteilt werden. Der Volumenfaktor wird berechnet:

$$\text{Volumenfaktor} = \frac{\text{Probenvolumen zur Extraktion } [\mu\text{l}]}{20 \mu\text{l (Standardvolumen)}}$$

Beispiel:

300 µl Probe wurde zur Extraktion eingesetzt und es wurde eine Konzentration von 0,6 ng/ml aus der Standardkurve abgelesen.

Volumenfaktor = 300 µl / 20 µl = 15

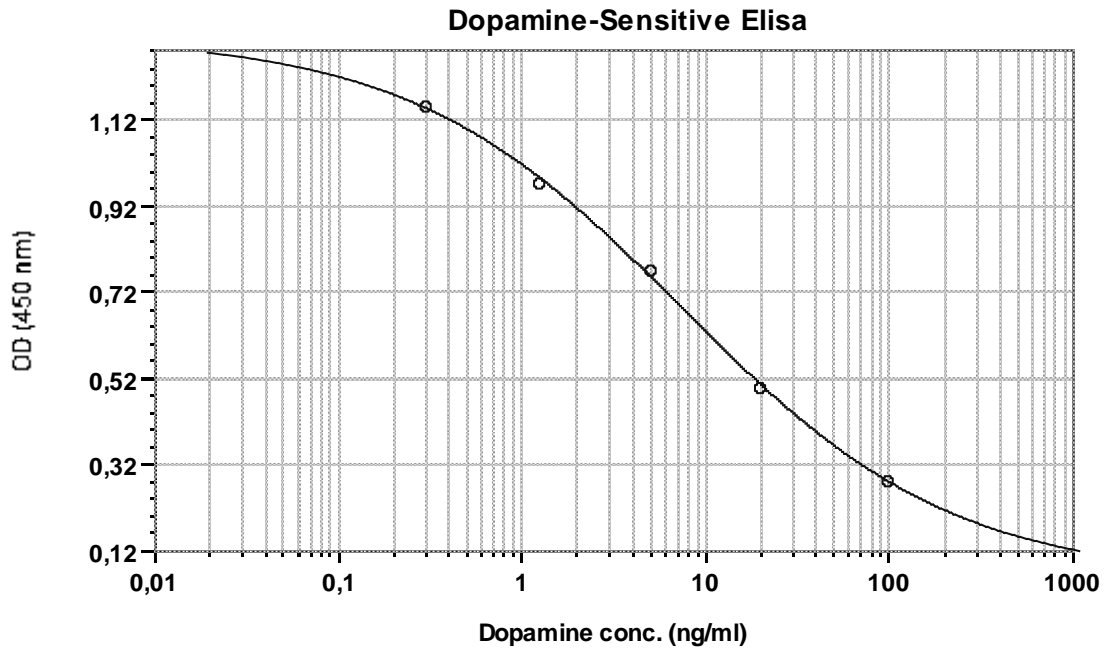
Konzentration der Probe = 0,6 ng/ml / 15 = 0,040 ng/ml = 40 pg/ml

Umrechnung in pmol/l:

Dopamin: 1 pg/ml = 6,53 pmol/l

Wurden die Proben mit Proben-Stabilisator angereichert, dann muss das Ergebnis mit dem entsprechenden Faktor laut Abschnitt 5 multipliziert werden.

Typisches Beispiel einer Standardkurve des Dopamin High Sensitive ELISAs:



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

	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>D</u>	<u>R<sup>2</sup></u>
○ Std (Standards: Concentration vs MeanValue)	1,313	0,587	7,325	0,056	0,999

## 9 Testcharakteristika

### 9.1 Sensitivität

Die untere Nachweisgrenze wurde bestimmt, indem die 2-fache Standardabweichung der optischen Dichte (OD) des Nullstandards gemessen und die entsprechende Konzentration an der Standardkurve abgelesen wurde. Die Nachweisgrenze ist abhängig vom Probenvolumen und kann mit dem entsprechenden Volumenfaktor (s. 8. Auswertung) berechnet werden:

	<b>Dopamin</b>
<b>Sensitivität:</b>	$\frac{89 \text{ pg/ml (581 pmol/l)}}{\text{Volumenfaktor}}$
<b>Beispiel für 300 µl Probe (Volumenfaktor 15):</b>	$\frac{89 \text{ pg/ml}}{15} = 5,9 \text{ pg/ml (39 pmol/l)}$

### 9.2 Spezifität (Kreuzreaktivitäten)

Der in dem Test verwendete Antikörper ist spezifisch für das entsprechende Antigen. Folgende Substanzen wurden hinsichtlich der Kreuzreaktivitäten getestet:

<b>Substanz</b>	<b>Kreuzreaktivität (%) Dopamin-Ak</b>
Dopamin	100
Adrenalin	< 0,020
Noradrenalin	0,23
Metanephrin	< 0,020
Normetanephrin	< 0,020
3-Methoxytyramin	0,28
L-Dopa	< 0,01
Tyramin	0,011
Tyrosin	< 0,01
Homovanillinsäure	< 0,01
Vanillinmandelsäure	< 0,01



### 9.3 Wiederfindung

Unterschiedliche Mengen an Dopamin wurden zu einer EDTA-Plasmaprobe bzw. Zellkulturmedium (RPMI 1640) gegeben und anschließend im ELISA gemessen. Die analytische Wiederfindung wurde bei verschiedenen Konzentrationen aus den theoretisch erwarteten und den praktisch gemessenen Werten ermittelt.

Konzentrationsangaben in pg/ml

Plasma				Zellkulturmedium				
zugesezt	gemessen	erwartet	Wdf (%)	zugesezt	gemessen	erwartet	Wdf (%)	
0,0	26,6			0,0	30,6			
13,4	35,4	40,0	88	13,4	35,3	44,0	80	
21,7	44,7	48,3	92	21,7	47,6	52,3	91	
37,9	63,7	64,5	99	37,9	62,7	68,5	92	
56,0	70,8	82,6	86	56,0	74,1	86,6	86	
151,5	157,0	178,1	88	151,5	167,0	182,1	92	
223,9	173,3	250,5	69	223,9	223,5	254,5	88	
294,1	297,5	320,7	93	294,1	273,5	324,7	84	
307,7	289,8	334,3	87	307,7	281,5	338,3	83	
606,1	615,3	632,7	97	606,1	632,1	636,7	99	
			Mittelwert:				Mittelwert:	88

### 9.4 Reproduzierbarkeit

Die Reproduzierbarkeit der ELISA-Methode wurde durch die Ermittlung des Intra-Assay-Variationskoeffizienten für EDTA-Plasma und Zellkulturmedium (DMEM) gezeigt.

Konzentrationsangaben in pg/ml

Probe	Anzahl n	Mittelwert	SD	VK (%)
EDTA-Plasma	16	289	23,7	<b>8,2</b>
Zellkulturmedium	24	235	30,1	<b>12,8</b>

## 10 Änderungen

In Abschnitt 4 wurde das Gefahrensymbol „Achtung“ beim POD Konjugat entfernt, da nicht mehr notwendig.

## Pipettierschema – Probenvorbereitung

EX-PLATE verwenden

		Standards	Kontrollen	Proben
CAL A – F	µl	20		
CON 1 & 2	µl		20	
Proben	µl			1 - 300
Dest. Wasser	µl	280	280	auffüllen auf 300
EX-BUFF	µl	100	100	100

Platte mit FOIL abkleben; 60 Minuten bei RT schütteln  
Platte ausleeren und Flüssigkeitsreste ausklopfen

WASH	ml	1	1	1
------	----	---	---	---

5 Minuten bei RT vorsichtig schütteln  
Platte ausleeren und Flüssigkeitsreste ausklopfen

ACYL-BUFF	µl	150	150	150
ACYL-REAG	µl	50	50	50

**Sofort** 20 Minuten bei RT schütteln  
Platte ausleeren und Flüssigkeitsreste ausklopfen

WASH	ml	1	1	1
------	----	---	---	---

5 Minuten bei RT vorsichtig schütteln  
Platte ausleeren und Flüssigkeitsreste ausklopfen  
Waschschritt 1x wiederholen  
Platte ausleeren und Flüssigkeitsreste ausklopfen

HCl	µl	125	125	125
-----	----	-----	-----	-----

Platte mit FOIL abkleben; 20 Minuten bei RT schütteln  
**Platte anschließend nicht ausleeren**

## ENZYME-PLATE verwenden

		Standards	Kontrollen	Proben
Transfer von EX-PLATE in ENZYME-PLATE	µl	100	100	100
Enzymmix (frisch)	µl	20	20	20

Platte mit FOIL abkleben; 1 Minute bei RT schütteln

90 Minuten bei 37 °C inkubieren

**Platte anschließend nicht ausleeren**

## Pipettierschema – ELISA

STRIPS-DA verwenden

		vorbereitete Standards	vorbereitete Kontrollen	vorbereitete Proben
Transfer von ENZYME-PLATE in STRIPS-DA	µl	100	100	100

AS-DA	µl	20	20	20
-------	----	----	----	----

Platte mit FOIL abkleben

Kurz auf dem Horizontalschüttler mischen und für 15 – 20 Stunden (über Nacht) bei 2 - 6 °C inkubieren

WASH	µl	250	250	250
------	----	-----	-----	-----

Platte ausleeren und Flüssigkeitsreste ausklopfen

Waschschritt 3 x wiederholen

Platte ausleeren und Flüssigkeitsreste ausklopfen

CONJ	µl	100	100	100
------	----	-----	-----	-----

60 Minuten bei Raumtemperatur schütteln

WASH	µl	250	250	250
------	----	-----	-----	-----

Platte ausleeren und Flüssigkeitsreste ausklopfen

Waschschritt 3 x wiederholen

Platte ausleeren und Flüssigkeitsreste ausklopfen

SUB	µl	100	100	100
-----	----	-----	-----	-----

35 - 45 Minuten bei Raumtemperatur schütteln

STOP	µl	100	100	100
------	----	-----	-----	-----

Messung der Extinktion bei 450 nm innerhalb von 15 Minuten