



## Gebrauchsanweisung

# Noradrenaline High Sensitive ELISA

(Hochsensitiv und für kleine Probenvolumina)

Enzymimmunoassay für die  
Quantitative Bestimmung von  
**Noradrenalin**

**RUO**

Nur für Forschungszwecke

**REF**

EA633/96



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 Noradrenaline High Sensitive ELISA-Kit enthält Reagenzien für die quantitative Bestimmung von Noradrenalin in niedrigkonzentrierten Proben bzw. für kleine Probenvolumina.

Noradrenalin wird mittels eines cis-Diol-spezifischen Boronat-Affinitätsgels extrahiert, acyliert und anschließend enzymatisch in N-Acylnormetanephrin umgewandelt.

Der Noradrenaline High Sensitive ELISA ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay. Noradrenalin ist an die Festphase der Mikrotiterplatte gebunden. Acyliertes Noradrenalin aus der Probe und an die Festphase gebundenes Noradrenalin 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 Noradrenalins 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

**Standards (A - F)** CAL A - F 6 Fläschchen  
 Je 4 ml, gebrauchsfertig  
 Konzentrationen:

Standard	A	A/B*	B	C	D	E	F
Noradrenaline (ng/ml)	0	0,05	0,15	0,5	1,5	5	25
Noradrenaline (nmol/l)	0	0,30	0,89	3,0	8,9	29,6	148

\*Der Standard A/B ist vom Anwender selbst anzusetzen. Siehe 6.1.3

**Kontrolle 1 & 2** CON 1 & 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. Plastikschälchen. Sie reagieren  
 nicht mit normalen Pipettenspitzen und Glasgefäßen.



Gefahr  
 Achtung

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



## 4.2 Reagenzien für den ELISA

<b>Noradrenalin-Antiserum</b> 2,5 ml, gebrauchsfertig, vom Kaninchen Gelb gefärbt	<b>AS-NAD</b>	1 Fläschchen
<b>MT-Streifen</b> Mikrotiterstreifen mit je 8 Kavitäten, einzeln abbrechbar Vorbeschichtet mit: Noradrenalin	<b>STRIPS-NAD</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
- Multipipetten 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.

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.:

<b>Probenvolumen</b>	<b>+ Stabilisatorvolumen</b>	<b>= Totalvolumen</b>
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.

### 5.3 Gewebehomogenate

Gewebehomogenate 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.

#### 6.1.3 Standard A/B

In einem Röhrchen oder Reaktionsgefäß aus Polypropylen (PP) 400 µl Standard A **CAL A** vorlegen und 200 µl Standard B **CAL B** hinzufügen. Mischen.

Standard A/B muss vor jedem Testsatz frisch angesetzt werden. Reste verwerfen.

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 der Standards **CAL A**, **CAL A/B** (s. 6.1.3), **CAL B** – **CAL F**, je 20 µl der Kontrollen **CON 1** & **CON 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-NAD** übertragen.  
(Die angebrochene Enzymplatte nicht verwerfen, sondern für den zweiten und dritten Testansatz mit einer Folie versiegelt, aufbewahren)
2. Je 20 µl Noradrenalin-Antiserum **AS-NAD** (gelb 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.

$$\text{Volumenfaktor} = 300 \mu\text{l} / 20 \mu\text{l} = 15$$

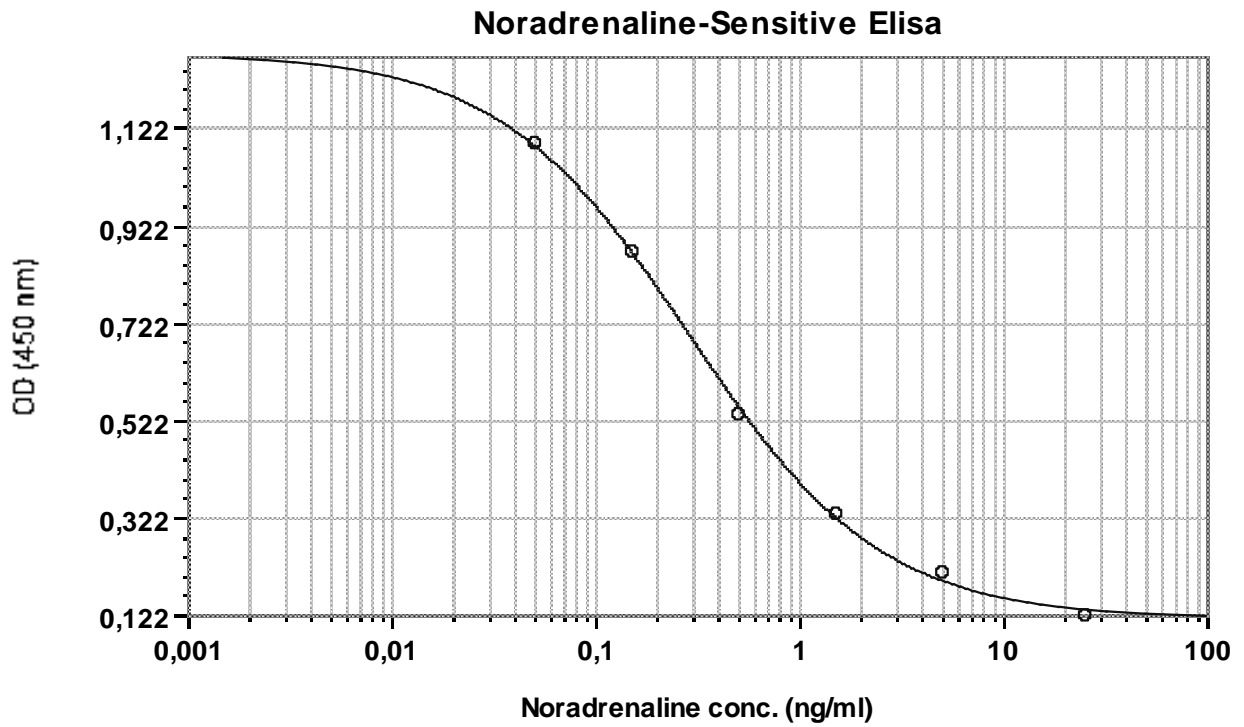
$$\text{Konzentration der Probe} = 0,6 \text{ ng/ml} / 15 = 0,040 \text{ ng/ml} = 40 \text{ pg/ml}$$

Umrechnung in pmol/l:

$$\text{Noradrenalin: } 1 \text{ pg/ml} = 5,91 \text{ pmol/l}$$

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 Noradrenaline 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)	1,277	0,929	0,286	0,117	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>Noradrenalin</b>
<b>Sensitivität:</b>	$\frac{15 \text{ pg/ml (89 pmol/l)}}{\text{Volumenfaktor}}$
<b>Beispiel für 300 µl Probe (Volumenfaktor 15):</b>	$\frac{15 \text{ pg/ml}}{15} = 1,0 \text{ pg/ml (5,9 pmol/l)}$

### 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 (%) Noradrenalin-Ak</b>
Noradrenalin	100
Adrenalin	< 0,012
Dopamin	0,092
Metanephrin	< 0,012
Normetanephrin	0,16
3-Methoxytyramin	< 0,012
L-Dopa	< 0,005
Tyramin	< 0,005
Tyrosin	< 0,005
Homovanillinsäure	< 0,005
Vanillinmandelsäure	< 0,005



### 9.3 Wiederfindung

Unterschiedliche Mengen an Noradrenalin 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	4,5			0,0	1,1		
6,7	10,4	11,2	92	6,7	7,1	7,8	91
10,9	14,5	15,4	94	10,9	13,2	12,0	110
15,2	20,4	19,7	104	15,2	15,4	16,3	95
22,4	27,5	26,9	102	22,4	22,7	23,5	97
45,5	45,5	50,0	91	45,5	48,9	46,6	105
67,2	58,9	71,7	82	67,2	59,1	68,3	87
88,2	80,3	92,8	87	88,2	82,9	89,4	93
151,5	131,7	156,0	84	151,5	108,7	152,6	71
294,1	246,0	298,7	82	294,1	246,6	295,3	84
		Mittelwert:	91			Mittelwert:	92

### 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	113,1	7,57	6,7
Zellkulturmedium	16	21,9	1,07	4,9

## 10 Änderungen

Version 8: 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, A/B, B – 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-NAD verwenden

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

AS-NAD	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