



## Arbeitsanleitung

# Serotonin High Sensitive ELISA

(Hochsensitiv und für kleine Probenvolumina)

Hochsensitiver Enzymimmunoassay für die  
Quantitative Bestimmung von  
**Serotonin**

Nur für Forschungszwecke

**REF** EA630/96

 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	Einleitung und Testprinzip.....	5
2	Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen.....	5
3	Lagerung und Haltbarkeit.....	6
4	Inhalt des Testbesteck.....	6
5	Probengewinnung.....	8
6	Vorbereitung der Proben und Reagenzien.....	9
7	Testdurchführung ELISA.....	12
8	Testauswertung.....	13
9	Testcharakteristika.....	14
10	Änderungen.....	15
	Pipettierschema Probenvorbereitung.....	16
	Pipettierschema ELISA.....	16

## Verwendete Symbole

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

## Gefahrensymbole

	Gefahr		Achtung
---	--------	---	---------



## 1 Einleitung und Testprinzip

Der Serotonin High Sensitive ELISA enthält Reagenzien für die quantitative Bestimmung von derivatisiertem Serotonin (5-Hydroxytryptamin) in niedrigkonzentrierten Proben bzw. für kleine Probenvolumina. Die Derivatisierung erfolgt während der Probenvorbereitung. Dabei wird Serotonin durch das Acylierungsreagenz quantitativ in N-Acylserotonin umgewandelt.

Der Serotonin-Sensitive ELISA ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay, in dem die Antigene um eine definierte Anzahl von Antikörper-Bindungsstellen konkurrieren. 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

- Nur für Forschungszwecke. Nur für den Gebrauch durch Fachpersonal. 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 vorbereiteten 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 Testbesteck

<b>MT-Streifen</b>	<b>STRIPS</b>	12 Stück
Mikrotiterstreifen mit je 8 Vertiefungen Einzel abbrechbar		
<b>Standard</b>	<b>CAL</b>	1 Flasche
4 ml, Konzentrat, Konzentration: 500 ng/ml Einsatzkonzentrationen werden aus diesem Standard verdünnt (s. auch 6.1.2.)		
<b>Kontrolle 1 &amp; 2</b>	<b>CON 1 &amp; 2</b>	2 Flaschen
Je 4 ml, Konzentrat Vor dem Einsatz 1:500 verdünnen (s. auch 6.1.3.) Bereich: siehe Q.C.-Zertifikat		
<b>Acylierungs-Reagenz</b>	<b>ACYL-REAG</b>	2 x 2 Flaschen
Lyophilisiert, Inhalt einer Flasche mit 2,5 ml <b>SOLVENT</b> lösen (s. auch 6.1.5.)		
<b>Acylierungspuffer</b>	<b>ACYL-BUFF</b>	1 Flasche
Lyophilisiert, mit 4 ml destilliertem Wasser lösen, 200 µl Acylierungspufferkonzentrat [ACYL-BUFF-CONC] hinzugeben, vorsichtig mischen, übermäßige Schaumbildung vermeiden (s. auch 6.1.4.)		
<b>Acylierungspufferkonzentrat</b>	<b>ACYL-BUFF-CONC</b>	2 x 2 Flaschen
1 ml, Konzentrat, gelb eingefärbt		 Achtung

<b>Deaktivator</b> 3 ml, gebrauchsfertig, blau eingefärbt	<b>DEAC</b>		1 Flasche
<b>Enzymkonjugat</b> 12 ml, gebrauchsfertig Anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase	<b>CONJ</b>		1 Flasche
<b>Waschpuffer</b> 20 ml, Konzentrat Inhalt mit dest. Wasser auf 500 ml auffüllen (s. auch 6.1.6.)	<b>WASH</b>		1 Flasche
<b>Substrat</b> 12 ml TMB Lösung, gebrauchsfertig	<b>SUB</b>		1 Flasche
<b>Stopplösung</b> 12 ml, gebrauchsfertig Enthält 0.3M Schwefelsäure	<b>STOP</b>		1 Flasche
<b>Solvent</b> 6 ml, gebrauchsfertig, enthält Aceton	<b>SOLVENT</b>	 	2 Flaschen Achtung Gefahr
<b>Ascorbinsäure</b> 2 ml, gebrauchsfertig Enthält 10%ige Ascorbinsäure	<b>ASC-ACID 10%</b>		1 Flasche
<b>Standardpuffer</b> 50 ml, 10 mM PBS (0,9% NaCl), stabilisiert Muss vor dem Einsatz auf 0,1% Ascorbinsäure angereichert werden (s. auch 6.1.1.)	<b>STD-BUFF</b>		1 Flasche
<b>Reaktionsplatte</b> Für die Acylierung, gebrauchsfertig	<b>ACYL-PLATE</b>		1 Stück
<b>Haftklebefolie</b> gebrauchsfertig	<b>FOIL</b>		2 Stück

Weiter werden benötigt (nicht im Kit enthalten):

- Pipetten für 10, 20, 25, 50, 100 und 200 µl
- Mehrkanalpipette oder Waschgerät
- Photometer für die Auswertung von Mikrotiterplatten (450 nm)
- Horizontalschüttler
- Destilliertes Wasser

## 5 Probengewinnung

Der Test ist ausgelegt für kleine Probenvolumina bzw. sehr niedrige Konzentrationen in Gewebehomogenaten, Dialysaten und allgemein für verdünnte Proben.

Zur Vermeidung des oxidativen Zerfalls des Serotonins müssen die Proben 0,1 % Ascorbinsäure enthalten.

Die Proben können bis zu 6 Stunden bei 2 - 8 °C gelagert werden. Proben, die nicht sofort in dem Test eingesetzt werden, müssen bei -20 °C gelagert werden.

Wiederholtes Einfrieren und Wiederaufbauen sollte vermieden werden.

Als Verdünnungsmedium können unterschiedliche Puffer eingesetzt werden. Die Einstellung des Testes erfolgte mit Ringer-Puffer bzw. PBS (0,9% NaCl). Optional kann der Standardpuffer verwendet werden, aber auch die Einführung anderer Puffer ist nach vorheriger Überprüfung möglich. Alle als Verdünnungsmedium eingesetzten Puffer müssen auf 0,1 % Ascorbinsäure angereichert sein.

Für kleine Probenvolumina (< 20 µl) muss ein Ausgleich des Volumens mit Verdünnungsmedium (optional: Standardpuffer) stattfinden, so dass jeweils ein Probenvolumen von 20 µl erreicht wird.

Folgende Tabelle dient als Beispiel:

Probenvolumen	Verdünnungsmedium
1 µl	19 µl
2 µl	18 µl
5 µl	15 µl
10 µl	10 µl
15 µl	5 µl
20 µl	/

## 6 Vorbereitung der Proben und Reagenzien

### 6.1 Vorbereitung der Reagenzien

#### 6.1.1 Standardpuffer

Der Standardpuffer [STD-BUFF] ist vor dem Einsatz auf 0,1 % Ascorbinsäure anzureichern: 50 ml Standardpuffer + 0,5 ml [ASC-ACID 10%].

Der gebrauchsfertige Standardpuffer muss für den späteren Gebrauch bei -20 °C eingefroren werden und bleibt so bis zum angegebenen Verfallsdatum verwendbar.

#### 6.1.2 Standard

Der mitgelieferte Standard [CAL] besitzt eine Serotoninkonzentration von 500 ng/ml (= 10.000 pg/sample).

Zur Erstellung einer Std-Kurve muss dieser auf folgende Konzentrationen verdünnt werden:

<b>Std 6</b>	100 pg/sample	990 µl Verdünnungsmedium	+	10 µl CAL
<b>Std 5</b>	20 pg/sample	800 µl Verdünnungsmedium	+	200 µl Std 6
<b>Std 4</b>	6,7 pg/sample	933 µl Verdünnungsmedium	+	67 µl Std 6
<b>Std 3</b>	2 pg/sample	980 µl Verdünnungsmedium	+	20 µl Std 6
<b>Std 2</b>	0,67 pg/sample	993 µl Verdünnungsmedium	+	6,7 µl Std 6
<b>Std 1</b>	0 pg/sample	1000 µl Verdünnungsmedium		

Als Verdünnungsmedium sollte der gleiche Puffer eingesetzt werden, mit dem auch die Proben gewonnen bzw. verdünnt wurden.

Optional: Zur Standard- und Probenverdünnung ist der Standardpuffer geeignet.

Alle als Verdünnungsmedium eingesetzten Puffer müssen zur Stabilisierung 0,1 % Ascorbinsäure enthalten (auch der Standardpuffer).

Die Verdünnung sollte in Polypropylen(PP)röhrchen, in Eppendorf Cups bzw. Reaktionsgefäßen aus PP erfolgen.

Die Standards sollten unmittelbar vor Gebrauch frisch angesetzt werden

### 6.1.3 Kontrolle 1 & 2

Die mitgelieferten Kontrollen [CON1] & [CON 2] müssen vor dem Einsatz 1:500 verdünnt werden.

Kontrolle 1 (1:500):	5000 µl Verdünnungsmedium	+	10 µl CON 1
Kontrolle 2 (1:500):	5000 µl Verdünnungsmedium	+	10 µl CON 2

Als Verdünnungsmedium sollte der gleiche Puffer eingesetzt werden, mit dem auch die Proben gewonnen bzw. verdünnt wurden.

Optional kann der Standardpuffer verwendet werden.

Die Kontrollen sollten unmittelbar vor Gebrauch frisch angesetzt werden

### 6.1.4 Acylierungspuffer

Inhalt des Fläschchens [ACYL-BUFF] in 4 ml destilliertem Wasser lösen.

200 µl Acylierungspufferkonzentrat [ACYL-BUFF-CONC] hinzugeben. Kurz mischen und 30 min auf einen Rollmischer bzw. Horizontal-schüttler legen. Vorsichtig mischen, übermäßige Schaumbildung vermeiden.

Der gelöste Acylierungspuffer muss für den späteren Gebrauch bei -20 °C eingefroren werden und bleibt so bis zum angegebenen Verfallsdatum verwendbar.

### 6.1.5 Acylierungsreagenz

Inhalt des Fläschchens [ACYL-REAG] in je 2,5 ml [SOLVENT] lösen und für 5 min auf einen Rollmischer bzw. Horizontalschüttler legen. Das Acylierungs-reagenz sollte unmittelbar vor Gebrauch frisch angesetzt werden und nach Gebrauch ist das Restreagenz zu verwerfen. Durch die vier Fläschchen im Kit ist der ELISA in vier Ansätzen teilbar. Wenn der Kit in einem Ansatz verbraucht werden soll, den aufgelösten Inhalt zweier Fläschchen vereinigen.

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

Solvent ist leicht flüchtig und verdampft schnell. Daher bitte keine Gefäße zusammen mit Mehrkanalpipetten verwenden, da sie eine hohe Oberfläche besitzen. Bitte Multipetten o.ä. verwenden, das aufgelöste Acylierungsreagenz direkt aus dem Fläschchen aufziehen und Vertiefung für Vertiefung pipettieren.

### 6.1.6 Waschpuffer

Inhalt des Fläschchens [WASH] 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.

Alle anderen Reagenzien sind gebrauchsfertig.

### 6.2 Probenvorbereitung (Acylierung)

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

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

1. Je **25 µl Acylierungspuffer** in alle zu verwendenden Vertiefungen der Reaktionsplatte pipettieren.
2. Je **20 µl verdünnter Standard 1 - 6, Kontrolle 1 & 2 und Probe** in die jeweiligen Vertiefungen pipettieren.

Platte kurz schütteln.

3. Je **10 µl frisch zubereitetes Acylierungsreagenz** in alle Vertiefungen pipettieren (Rotfärbung) und **sofort** mit Punkt 4. fortfahren.

Solvent ist leicht flüchtig und verdampft schnell. Daher bitte keine Gefäße zusammen mit Mehrkanalpipetten verwenden, da sie eine hohe Oberfläche besitzen. Bitte Multipetten o.ä. verwenden, das aufgelöste Acylierungsreagenz direkt aus dem Fläschchen aufziehen und Vertiefung für Vertiefung pipettieren.

4. Platte 60 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler inkubieren, dabei darf die Platte keinem direkten Sonnenlicht ausgesetzt sein.

Platte **nicht** abkleben oder abdeckeln, Platte offen schütteln.

5. Je **25 µl Deaktivator** in alle Vertiefungen pipettieren.
6. Platte **mit** Haftklebefolie abdecken und 3 Stunden bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler inkubieren, dabei darf die Platte keinem direkten Sonnenlicht ausgesetzt sein.

Je 50 µl der so vorbereiteten Proben werden in dem ELISA eingesetzt.

## 7 Testdurchführung ELISA

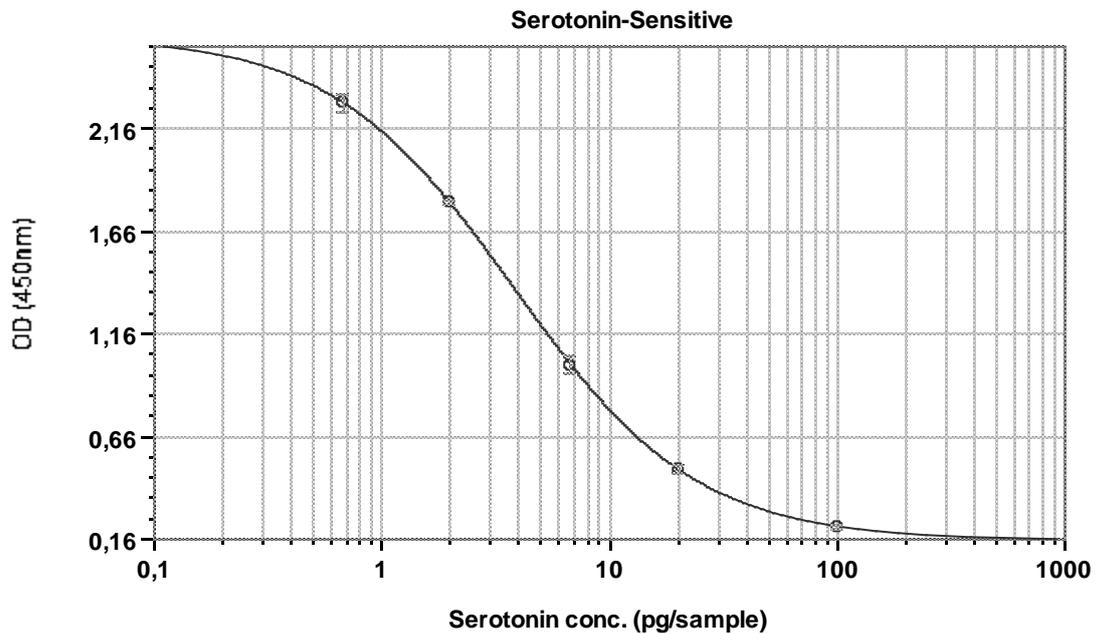
Die Reagenzien auf Raumtemperatur bringen und sorgfältig mischen, Schaumbildung vermeiden.

1. Je **50 µl vorbereitete Standards 1 bis 6, Kontrollen und Proben** in die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen pipettieren.
2. Platte mit Haftklebefolie abdecken und 15 - 20 Stunden (über Nacht) bei 2 – 8 °C inkubieren.
3. Vertiefungen entleeren, mit ca. **300 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.
4. Jeweils **100 µl Enzymkonjugat** in alle Vertiefungen pipettieren.
5. 60 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler inkubieren.
6. Waschen: Wie unter Punkt 3. beschrieben.
7. Jeweils **100 µl Substrat** in alle Vertiefungen pipettieren.
8. 20 bis 30 Minuten bei Raumtemperatur (20 – 25 °C) auf einem Horizontalschüttler inkubieren.
9. Jeweils **100 µl Stopplösung** in alle Vertiefungen pipettieren.
10. Streifen sofort (innerhalb 10 Minuten) im Mikrotiterplattenphotometer bei einer Messwellenlänge von 450 nm (Referenzwellenlänge zwischen 570 nm und 650 nm) messen.

## 8 Testauswertung

Die OD-Werte der Standards (linear) werden gegen die entsprechenden Konzentrationen der Standards (logarithmisch) aufgetragen. Die Konzentrationen der Kontrollen und der Proben können dann direkt aus der Eichkurve in pg/sample abgelesen werden.

Die folgende Abbildung zeigt ein typisches Beispiel einer Standardkurve.



$$y = \left( \frac{A - D}{1 + (x/C)^B} \right) + D$$

	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>D</u>	<u>R<sup>2</sup></u>
Std (Standards: Concentration vs MeanValue)	2,612	1,089	3,791	0,154	1

## 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.

**Sensitivität : 0,39 pg/sample**

### 9.2 Spezifität (Kreuzreaktivitäten)

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

Substanz	50% Inhibition (pg/sample)	Kreuzreaktivität (%)
Serotonin	4,3	100
Tryptamin	1.996	0,22
5-Methoxytryptamin	17.083	0,025
5-Hydroxytryptophan	207.551	0,0021
Melatonin	677.434	< 0,001
5-HIAA	> 2.000.000	< 0,001
L-Tryptophan	> 20.000.000	< 0,0001

### 9.3 Reproduzierbarkeit

Die Reproduzierbarkeit des Serotonin-Sensitive-ELISAs wurde durch die Ermittlung des Intra-Assay-Variationskoeffizienten gezeigt:

Konzentrationsangaben in pg/sample

Intra-Assay

Probe	Anzahl n	Mittelwert	SD	VK (%)
1	40	4,7	0,41	8,7
2	40	11,9	0,79	6,6

## **10 Änderungen**

Version 5: Die Arbeitsanleitung wurde neu formatiert.

Es wurden keine Änderungen an den Komponenten oder an der Durchführung vorgenommen.

### Pipettierschema Probenvorbereitung

		Standards	Kontrollen	Proben
Gelöst. ACYL-BUFF	µl	25	25	25
Verd. Standard 1 – 6	µl	20		
Verd. CON 1 & CON 2	µl		20	
Proben	µl			20

Platte kurz schütteln

Frisch angesetztes ACYL-REAG	µl	10	10	10
------------------------------	----	----	----	----

Platte **nicht** abkleben oder zudeckeln, Platte offen schütteln.  
60 Minuten bei Raumtemperatur schütteln

DEAC	µl	25	25	25
------	----	----	----	----

Platte abkleben und 3 Stunden bei Raumtemperatur schütteln

### Pipettierschema ELISA

		Standards	Kontrollen	Proben
Acyl. Standard 1 – 6	µl	50		
Acyl. CON 1 & CON 2	µl		50	
Acyl. Proben	µl			50

Platte abkleben  
15 – 20 Stunden (über Nacht) bei 2 - 8 °C inkubieren  
3 - 4 x Waschen

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

60 Minuten bei Raumtemperatur schütteln  
3 - 4 x Waschen

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

20 - 30 Minuten bei Raumtemperatur schütteln

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

Messung der Extinktion bei 450 nm