



## Gebrauchsanweisung


# BI-CAT<sup>®</sup> ELISA

Enzymimmunoassay für die  
Quantitative Bestimmung von  
**Adrenalin und Noradrenalin in Plasma, Urin,  
Zellkulturproben und allgemein biologischen Proben**


**RUO**

Nur für Forschungszwecke  
Nicht für diagnostische Zwecke verwenden

**REF** EA613/192

 2x (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 .....	4
2	Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen .....	5
3	Lagerung und Haltbarkeit .....	5
4	Inhalt des Kits .....	6
5	Probengewinnung und -lagerung .....	8
6	Vorbereitung der Reagenzien und Proben .....	11
7	Testdurchführung ELISA.....	14
8	Auswertung .....	16
9	Testcharakteristika .....	18
10	Änderungen.....	21
	Pipettierschema - Probenvorbereitung .....	23
	Pipettierschema - ELISA .....	24

## Verwendete Symbole

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

Die Symbole der Komponenten des Kits sind im Kapitel 4 Inhalt des Kits beschrieben.

## 1 Einführung und Testprinzip

Der BI-CAT® ELISA Kit enthält Reagenzien und Materialien für die quantitative Bestimmung von Adrenalin und Noradrenalin in Plasma, Urin, Zellkulturproben, Gewebehomogenaten und sonstigen Proben.

Catecholamine ist die Bezeichnung für eine Gruppe von aromatischen Aminen (Noradrenalin, Adrenalin und Dopamin, sowie deren Derivate), die als Hormone bzw. Neurotransmitter wirken. Adrenalin und Noradrenalin werden aus Dopamin gebildet. Sie wirken auf die Herzmuskulatur und den Stoffwechsel (Adrenalin), sowie auf den peripheren Kreislauf (Noradrenalin) und dienen so der Adaption des Körpers an akuten und chronischen Stress.

Dieser Assay ist nur für Forschungszwecke vorgesehen. Nicht für diagnostische Zwecke verwenden.

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

Der BI-CAT® ELISA ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay. Adrenalin bzw. Noradrenalin sind an die Festphase der Mikrotiterplatte gebunden. Acylierte Catecholamine aus der Probe und an die Festphase gebundene Catecholamine 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 Catecholamine in der Probe.

## 2 Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

- Nur für Forschungszwecke. Nur für den Gebrauch durch Fachpersonal.
- Vor der Testdurchführung sollte die Gebrauchsanweisung vollständig gelesen und deren Inhalt verstanden worden sein. Die gültige Version aus dem Kit verwenden.
- Alle Reagenzien dieses Kits, 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.
- Einzelne Komponenten verschiedener Chargen und Kits sollten nicht ausgetauscht werden. Die auf der Verpackung und den Etiketten der einzelnen Komponenten angegebenen Verfallsdaten und Lagerbedingungen sind zu beachten.
- Beim Handhaben der Reagenzien, Kontrollen und Proben sind die gängigen Laborsicherheitsrichtlinien und die Gute Laborpraxis zu beachten.
- Ein Teil der Komponenten dieses Testkits enthalten Gefahrstoffe und sind kennzeichnungspflichtig. Diese Komponenten tragen das entsprechende Gefahrensymbol auf ihrem Etikett. Weitere Informationen befinden sich in 4. Inhalt des Testkits und auf den entsprechenden Sicherheitsdatenblättern.
- Während der Testdurchführung Kittel, Einmal-Handschuhe und Schutzbrille tragen.
- Vermeiden Sie alle Handlungen, die zu einem Verschlucken, Einatmen oder Injizieren der Reagenzien führen könnten. Niemals mit dem Mund pipettieren.
- 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 wird bei Umgebungstemperatur geliefert und ist anschließend bei Lagerung zwischen 2 - 8 °C bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar. Nach Anbruch ist der Kit bis zum Verfallsdatum haltbar.

Die Haltbarkeit der gebrauchsfertigen Reagenzien ist auf dem jeweiligen Flaschenetikett angegeben. Die Haltbarkeit und die Lagerung der vorbereiteten Reagenzien werden unter 6.1 geregelt.

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

## 4 Inhalt des Kits

### 4.1 Reagenzien für die Probenvorbereitung

#### Extraktionsplatte

Je 48 Vertiefungen beschichtet mit Boronat-Affinitätsgel

EX-PLATE

2 Stück

#### Extraktionspuffer

Je 6 ml, gebrauchsfertig

EX-BUFF

2 Fläschchen

#### Salzsäure

13 ml, gebrauchsfertig, 0,025 M HCl

HCL

1 Fläschchen

#### Standards (1 - 6)

Je 4 ml, gebrauchsfertig, Konzentrationen:

CAL 1 - CAL 6

6 Fläschchen

CAL		1	2	3	4	5	6
Adrenalin	(ng/ml)	0	0,15	0,5	1,5	5	15
	(nmol/l)	0	0,82	2,7	8,2	27,3	81,9
Noradrenalin	(ng/ml)	0	1	3	10	30	100
	(nmol/l)	0	5,9	17,7	59,1	177	591

#### Kontrolle 1 & 2

Je 4 ml, gebrauchsfertig, Konzentrationen:  
siehe QC Zertifikat

CON 1 &amp; CON 2

2 Fläschchen

#### Acylierungs-Reagenz

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

ACYL-REAG

1 Fläschchen



Achtung



Gefahr

#### Acylierungs-Puffer

20 ml, gebrauchsfertig

ACYL-BUFF

1 Fläschchen

#### Enzym

Je 2 ml, lyophilisiert,  
Catechol-O-Methyltransferase

ENZYME

3 Fläschchen

**Coenzym**

1,75 ml, gebrauchsfertig, S-Adenosyl-L-Methionin

**COENZYME**

1 Fläschchen

**Enzym-Puffer**

2 ml, gebrauchsfertig

**ENZYME-BUFF**

1 Fläschchen



Achtung

**Proben-Stabilisator**

20 ml, gebrauchsfertig

**STABILIZER**

1 Fläschchen



Achtung

**4.2 Reagenzien für den ELISA****Adrenalin-Antiserum**

4 ml, gebrauchsfertig, vom Kaninchen, blau gefärbt

**AS-AD**

1 Fläschchen



Achtung

**Noradrenalin-Antiserum**

6 ml, gebrauchsfertig, vom Kaninchen, gelb gefärbt

**AS-NAD**

1 Fläschchen



Achtung

**MT-Streifen**Mikrotiterstreifen mit je 8 Kavitäten, einzeln abbrechbar  
Vorbeschichtet mit: Adrenalin, blau markiert**STRIPS-AD**

12 Stück

**MT-Streifen**Mikrotiterstreifen mit je 8 Kavitäten, einzeln abbrechbar  
Vorbeschichtet mit: Noradrenalin, gelb markiert**STRIPS-NAD**

12 Stück

**Enzymkonjugat**Je 12 ml, gebrauchsfertig,  
Anti-Kaninchen IgG-Peroxidase**CONJ**

2 Fläschchen



Achtung

**Waschpuffer**

Je 20 ml, Konzentrat, Inhalt mit bidest. Wasser auf 1000 ml auffüllen

**WASH**

2 Fläschchen

<b>Substrat</b> 12 ml TMB Lösung, gebrauchsfertig	<b>SUB</b>	2 Fläschchen
<b>Stopplösung</b> 12 ml, gebrauchsfertig, enthält 0,3M Schwefelsäure	<b>STOP</b>	2 Fläschchen
<b>Haftklebefolie</b> gebrauchsfertig	<b>FOIL</b>	10 Stück

Weiter werden benötigt (nicht im Kit enthalten)

- Pipetten für 20, 25, 90, 500, 1000 µl
- Multipetten für 30, 50, 100, 150, 250, 1000µl
- Schüttler (horizontal)
- Mehrkanalpipette oder Waschgerät
- Photometer für die Messung von Mikrotiterplatten (450 nm)
- Destilliertes Wasser
- Papiertücher, Pipettenspitzen, Stoppuhr

## 5 Probengewinnung und -lagerung

### 5.1 Plasma

Für den Test kann EDTA-Plasma eingesetzt werden.

Hämolytische, ikterische 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. Falls möglich ist die Lagerung bei -80 °C zu bevorzugen.

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 (s. 8).

Empfohlen wird zur Blutentnahme Spezialröhrchen mit EGTA / Gluthation (GSH) zu verwenden. Eine zusätzliche Zugabe des Stabilisator **STABILIZER** ist dann nicht erforderlich.

Stabilisierte Plasmen vor dem Gebrauch mischen und zentrifugieren (10 Minuten 2.000 g).

Generell Plasmen nach dem Auftauen mischen und zentrifugieren (10 Minuten 2.000 g).

## 5.2 Urine

Es kann Spontanurin und Sammelurin verwendet werden. Aus Stabilitätsgründen müssen die Urine angesäuert werden.

Spontanurin: Urine mit Salzsäure ansäuern, z.B. 15 ml Urin + 100 µl 6 mol/l HCl.

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.

Urinproben vor Gebrauch mischen und zentrifugieren (z.B. 3 Minuten 3.000 g).

Urinproben vor Gebrauch 1:5 mit dest. Wasser verdünnen.

## 5.3 Zellkulturproben und allgemein biologische Proben

Die Lagerung und Stabilität dieser Proben ist vom Probenotyp 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. Falls möglich ist die Lagerung bei -80 °C zu bevorzugen.

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 (s. 8).

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

#### 5.4 Gewebehomogenate

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

Weitere Grundsätze für die Probengewinnung müssen berücksichtigt werden:

- Vermeidung zu hoher Säurekonzentrationen in der Probe, da diese die Pufferkapazität des Extraktionspuffers **EX-BUFF** übersteigen könnten. Während des ersten Schrittes der Extraktion (s. 6.2) muss ein pH-Wert  $\geq 7$  eingehalten werden. Dieses kann ggf. auch durch schrittweise Zugabe von zusätzlichem Extraktions-Puffer **EX-BUFF** ausgeglichen werden (50 µl-Schritte). Ggf. Prüfung durch 0,5 µl aus dem Extraktionsansatz auf pH-Papier. Angesäuerte Proben, die bereits einen pH-Wert  $\leq 5$  besitzen dürfen nicht zusätzlich mit dem Proben-Stabilisator **STABILIZER** 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

Die Reagenzien auf Raumtemperatur bringen.

#### 6.1.1 Vorbereitung des Waschpuffers

Inhalt jedes Fläschchens **WASH** (20 ml, 50x) mit destilliertem Wasser auf ein Endvolumen von 1000 ml auffüllen. Kurz mischen.

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

Wird der Kit in mehreren Ansätzen verwendet, sollte nur die dafür benötigte Menge Waschpuffer angesetzt werden.

#### 6.1.2 Vorbereitung des Enzymmixes

**ACHTUNG:** Der Enzymmix darf erst 20 - 30 Minuten vor Gebrauch angesetzt werden. Nach Gebrauch ist das Restreagenz zu verwerfen.

Inhalt eines Fläschchens **ENZYME** mit 2 ml destilliertem Wasser auflösen. Anschließend 0,5 ml **COENZYME** und 0,5 ml **ENZYME-BUFF** dazu pipettieren (Endvolumen 3,0 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, sind mindestens zwei Fläschchen mit frisch hergestelltem Enzymmix anzusetzen und in einem ausreichend großem Fläschchen oder Röhrchen (z.B. 10 ml) miteinander zu vereinigen.

Alle anderen Reagenzien sind gebrauchsfertig.

## 6.2 Probenvorbereitung

Die Probenvorbereitung der Standards, Kontrollen und der Proben ist für Adrenalin und Noradrenalin identisch. Sie muss nur einmal, zusammen für beide Parameter in einer Extraktionsplatte, durchgeführt werden.

Alle Reagenzien auf Raumtemperatur bringen.

Es wird empfohlen Doppelbestimmungen durchzuführen.

Es werden je 20 µl Standards, Kontrollen und Urinproben (1:5 verdünnt) extrahiert.

Es werden je 300 µl Plasmaproben extrahiert.

Von den anderen biologischen Proben können 1 µl bis zu 300 µl extrahiert werden.

1. Je **20 µl Standard 1 – 6** [CAL 1] - [CAL 6], je **20 µl Kontrolle 1 & 2** [CON 1] & [CON 2], je **20 µl Urinprobe** (1:5 mit dest. Wasser verdünnt) in die entsprechenden Vertiefungen der Extraktionsplatte [EX-PLATE] pipettieren. Zu den Standards, Kontrollen und Urinproben je **250 µl destilliertes Wasser** zum Volumenausgleich hinzugeben.  
Je **300 µl Plasmaprobe** in die entsprechenden Vertiefungen pipettieren (kein Volumenausgleich erforderlich).  
Je 1 µl bis zu 300 µl der sonstigen Proben in die entsprechenden Vertiefungen pipettieren und zum Volumenausgleich mit dest. Wasser auf 300 µl auffüllen, d.h. z.B. 100 µl Probe + 200 µl dest. Wasser.
2. Je **100 µl Extraktions-Puffer** [EX-BUFF] in jede Vertiefung pipettieren.
3. 60 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
4. Die Platte ausleeren und Flüssigkeitsreste durch kräftiges Ausklopfen auf einer saugfähigen Unterlage (Papierhandtuch) entfernen.
5. Je **1 ml Waschpuffer** (s. 6.1.1) in jede Vertiefung pipettieren und 5 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler bei niedriger Schüttelfrequenz mischen.
6. Die Platte ausleeren und Flüssigkeitsreste durch kräftiges Ausklopfen auf einer saugfähigen Unterlage (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 dem nächsten Punkt fortfahren.  
Bitte beachten: Lösungsmittel reagieren mit vielen Plastikmaterialien, z.B. Plastikschrälchen. Sie reagieren nicht mit normalen Pipettenspitzen und Glasgefäßen.

9. 20 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
10. Die Platte ausleeren und Flüssigkeitsreste durch kräftiges Ausklopfen auf einer saugfähigen Unterlage (Papierhandtuch) entfernen.
11. Je **1 ml Waschpuffer** (s. 6.1.1) in jede Vertiefung pipettieren und 5 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler bei niedriger Schüttelfrequenz mischen.
12. Die Platte ausleeren und Flüssigkeitsreste durch kräftiges Ausklopfen auf einer saugfähigen Unterlage (Papierhandtuch) entfernen.
13. Waschvorgang aus Punkt 11. und 12. **zweimal** wiederholen.
14. Je **100 µl Salzsäure** **HCL** zur Elution der Catecholamine in jede Vertiefung pipettieren.
15. Platte mit Haftklebefolie **FOIL** abdecken und 20 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.  
**Vorsicht: Überstand nicht ausleeren!**
16. Je **50 µl des frisch vorbereiteten Enzymmixes** (s. 6.1.2) in jede Vertiefung der Extraktionsplatte pipettieren. Die entstehenden Rotfärbungen zeigen die bereits pipettierten Vertiefungen an.
17. Platte mit Haftklebefolie **FOIL** abdecken und 30 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.  
**Vorsicht: Überstand anschließend nicht ausleeren!**

Vom Überstand werden je **90 µl** im Adrenalin-ELISA und je **25 µl** im Noradrenalin-ELISA eingesetzt.

## 7 Testdurchführung ELISA

Die ELISAs werden für Adrenalin und Noradrenalin in getrennten Mikrotiterplatten durchgeführt.

### 7.1 Adrenalin ELISA

1. Je **90 µl vorbereitete Standards, Kontrollen und Proben** in die entsprechenden Vertiefungen der **STRIPS-AD** (blau markiert) pipettieren. Leichtes Schrägstellen der Extraktionsplatte erleichtert die Volumenaufnahme.
2. Je **30 µl Adrenalin-Antiserum** (blau) **AS-AD** in jede Vertiefung pipettieren.
3. Platte mit Haftklebefolie **FOIL** abdecken. Für 10 Sekunden auf dem Horizontal-schüttler mischen und **15 - 20** Stunden (über Nacht) bei 2 – 8 °C inkubieren.
4. Vertiefungen entleeren, mit ca. **250 µl Waschpuffer** (s. 6.1.1) 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 4 mal durchführen.
5. Je **100 µl Enzymkonjugat** **CONJ** in jede Vertiefung pipettieren.
6. 30 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. 10 Sekunden auf einem Horizontalschüttler schütteln. 30 ± 5 Minuten bei Raumtemperatur (20 – 25 °C) auf dem Arbeitstisch mit einer Box abgedeckt, ohne schütteln, inkubieren.
10. Je **100 µl Stopplösung** **STOP** in jede Vertiefung pipettieren. 10 Sekunden auf einem Horizontalschüttler schütteln.
11. Streifen im Mikrotiterplattenphotometer bei einer Messwellenlänge von 450 nm innerhalb 15 Minuten (Referenzwellenlänge zwischen 570 nm und 650 nm) messen.

## 7.2 Noradrenalin ELISA

1. Je **25 µl vorbereitete Standards, Kontrollen und Proben** in die entsprechenden Vertiefungen **STRIPS-NAD** (gelb markiert) pipettieren. Leichtes Schrägstellen der Extraktionsplatte erleichtert die Volumenaufnahme.
2. Je **50 µl Noradrenalin-Antiserum** (gelb) **AS-NAD** in jede Vertiefung pipettieren.
3. Platte mit Haftklebefolie **FOIL** abdecken. Für 10 Sekunden auf dem Horizontal-schüttler mischen und **15** - 20 Stunden (über Nacht) bei 2 – 8 °C inkubieren.
4. Vertiefungen entleeren, mit ca. **250 µl Waschpuffer** (s. 6.1.1) 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 4 mal durchführen.
5. Je **100 µl Enzymkonjugat** **CONJ** in jede Vertiefung pipettieren.
6. 30 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. 10 Sekunden auf einem Horizontalschüttler schütteln. 30 ± 5 Minuten bei Raumtemperatur (20 – 25 °C) auf dem Arbeitstisch mit einer Box abgedeckt, ohne schütteln, inkubieren.
10. Je **100 µl Stopplösung** **STOP** in jede Vertiefung pipettieren. 10 Sekunden auf einem Horizontalschüttler schütteln.
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 abgelesenen Konzentrationen korrigieren:

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

Urinproben: Die abgelesenen Konzentrationen der Urinproben müssen mit dem Faktor 5 multipliziert werden, da diese 1:5 verdünnt eingesetzt werden.

Plasmaproben: Die abgelesenen Konzentrationen der Plasmaproben müssen durch den Faktor 15 geteilt werden, da bei der Extraktion 300 µl Plasmaprobe im Verhältnis zu 20 µl Standard eingesetzt werden. Bei Stabilisierung (s. 5.1): Auf Grund des 20%igen-Zusatzes des Stabilisators muss die ermittelte Konzentration der Probe zusätzlich mit dem Faktor 1,2 multipliziert werden.

Sonstige Proben: 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:

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

Beispiel:

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

Volumenfaktor ist dann  $200 \mu\text{l} / 20 \mu\text{l} = 10$

Konzentration der Probe ist dann  $0,6 \text{ ng/ml} / 10 = 0,060 \text{ ng/ml} = 60 \text{ pg/ml}$

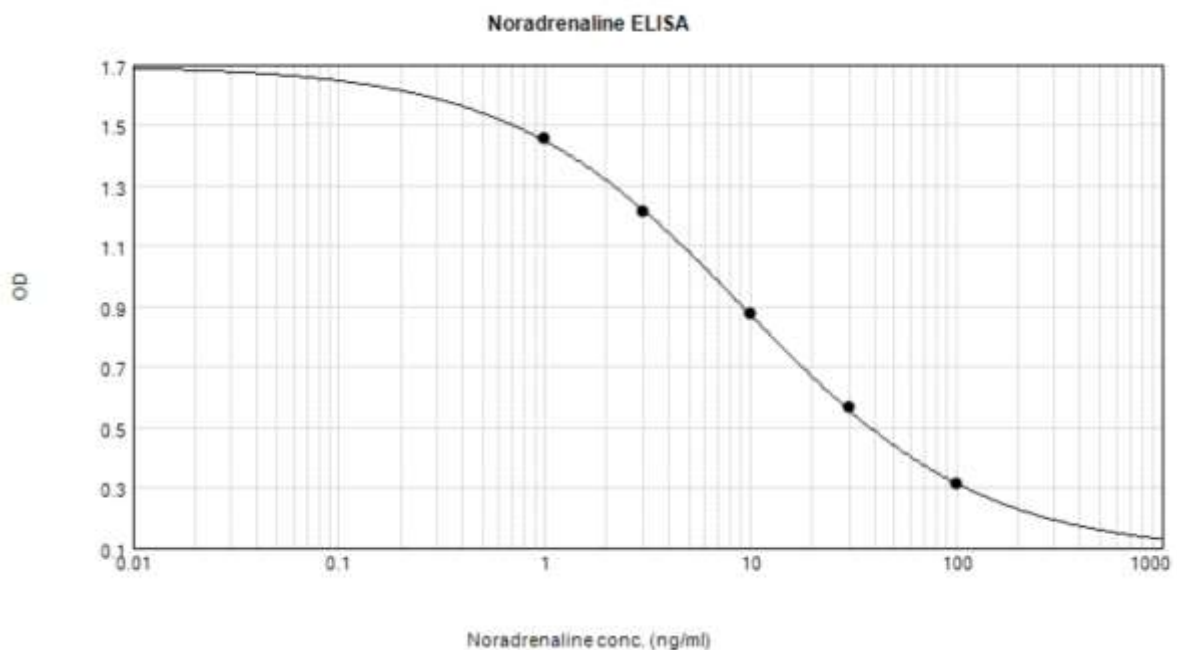
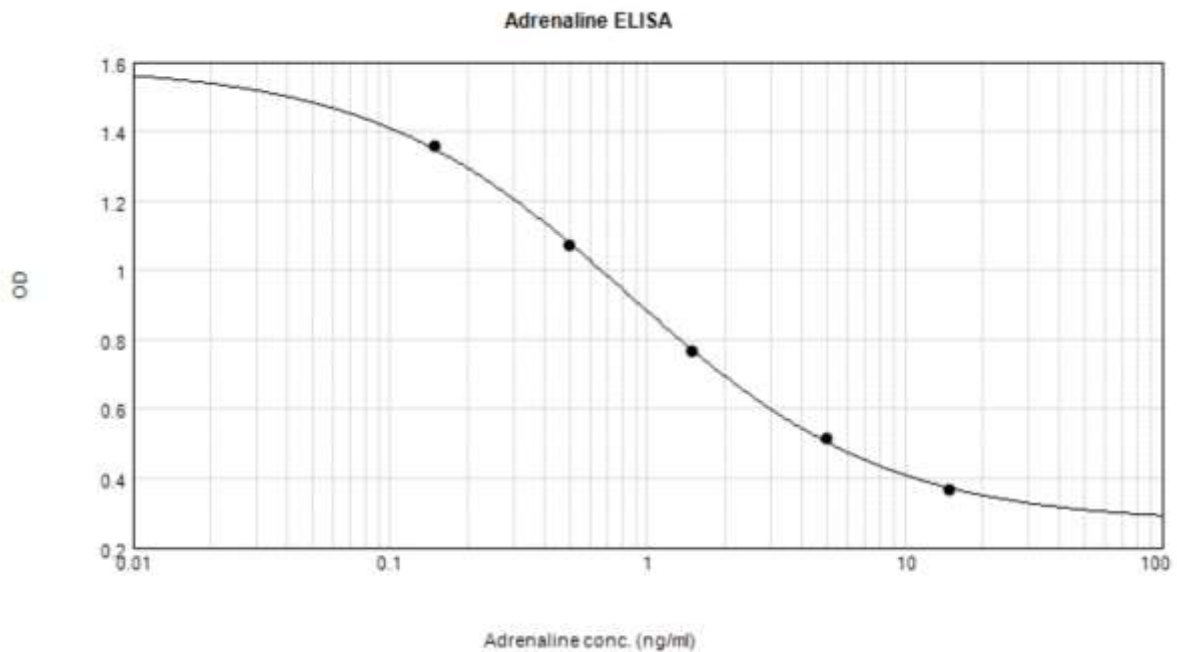
Bei Stabilisierung (s. 5.3): Auf Grund des 10%igen-Zusatzes des Stabilisators muss die ermittelte Konzentration der Probe zusätzlich mit dem Faktor 1,1 multipliziert werden.

Adrenalin:  $1 \text{ ng} / \text{ml} = 5,46 \text{ nmol} / \text{l}$

Noradrenalin:  $1 \text{ ng} / \text{ml} = 5,91 \text{ nmol} / \text{l}$

Qualitätskontrolle: Die Testergebnisse sind nur gültig, wenn die Kitkontrollen innerhalb der Bereiche entsprechend des Qualitätskontrollzertifikates liegen. Ansonsten sollte der Test wiederholt werden.

**Typische Beispiele** (nicht für die Berechnung der Ergebnisse verwenden):



## 9 Testcharakteristika

### 9.1 Assay Daten

#### 9.1.1 Sensitivität

##### Adrenalin

Matrix	Untere Nachweisgrenze	Berechnung
Urin	0,27 ng/ml	ODCal1 – 2xSD
EDTA-Plasma:	3,6 pg/ml	ODCal1 – 2xSD

##### Noradrenalin

Matrix	Untere Nachweisgrenze	Berechnung
Urin	0,44 ng/ml	ODCal1 - 2xSD
EDTA-Plasma	5,9 pg/ml	ODCal1 - 2xSD

#### 9.1.2 Spezifität (Kreuzreaktivitäten)

Substanz	Kreuzreaktivität (%) Adrenalin-Ak	Kreuzreaktivität (%) Noradrenalin-Ak
Adrenalin	100	< 0,0052
Noradrenalin	0,085	100
Dopamin	0,00041	0,68
Metanephrin	0,0013	< 0,002
Normetanephrin	< 0,0001	0,0040
3-Methoxytyramin	< 0,0001	< 0,002
L-Dopa	< 0,0001	< 0,002
Tyramin	< 0,0001	< 0,002
Tyrosin	< 0,00005	< 0,0006
Homovanillinsäure	< 0,00001	< 0,0002
Vanillinmandelsäure	< 0,00001	< 0,0002

### 9.1.3 Wiederfindung nach Spiken

#### Adrenalin

Matrix	Bereich (ng/ml)	Mittelwert (%)	Bereich (%)
Urin	2,1 – 25,8	105	102 – 110
EDTA-Plasma	0,008 – 0,237	92	87 – 98

#### Noradrenalin

Matrix	Bereich (ng/ml)	Mittelwert (%)	Bereich (%)
Urin	15,8 – 92,3	103	95 – 109
EDTA-Plasma	0,19 – 2,10	101	89 – 111

### 9.1.4 Linearität

#### Adrenalin

Matrix	Bereich (ng/ml)	Höchste Verd.	Mittelwert (%)	Bereich (%)
Urin	2,6 – 23,1	1 : 10 mit dest. Wasser	103	93 - 112
EDTA-Plasma	0,04 – 0,245	1 : 7 mit dest. Wasser	107	103 - 113

#### Noradrenalin

Matrix	Bereich (ng/ml)	Höchste Verd.	Mittelwert (%)	Bereich (%)
Urin	6,4 – 105,6	1 : 15 mit dest. Wasser	97	88 – 106
EDTA-Plasma	0,47 – 3,07	1 : 7 mit dest. Wasser	100	89 - 107

### 9.1.5 Reproduzierbarkeit

#### Adrenalin

Matrix	Bereich (ng/ml)	Intra-Assay-Vk
Urin	3,9 – 14,3	8,5 – 6,4 %
EDTA-Plasma	0,044 – 0,148	11,3 – 7,1 %

#### Noradrenalin

Matrix	Bereich (ng/ml)	Intra-Assay-Vk
Urin	27,5 – 74,3	11,0 – 4,7 %
EDTA-Plasma	0,247 – 1,009	13,1 – 8,0 %

### 9.1.6 Methodenvergleich

#### Adrenalin

Matrix	Vergleichsmethode	Korrelation
Urin	HPLC	$Y = 1,12 \times \text{HPLC} - 3,7$ ; $R = 0,982$ ; $N = 32$

#### Noradrenalin

Matrix	Vergleichsmethode	Korrelation
Urin	HPLC	$Y = 1,03 \times \text{HPLC} + 4,9$ ; $R = 0,994$ ; $N = 32$

### 9.2 Kalibrierung

Die Kalibrierung des BI-CAT® ELISA erfolgt durch Einwaage der Reinsubstanz. Die Richtigkeit der Methode wurde durch den Methodenvergleich (s. 9.1.6) festgestellt.

### 9.3 Grenzen der Methode

Proben, die oberhalb des höchsten Standards gemessen wurden, müssen mit dem entsprechenden Medium (s. 9.1.4) verdünnt und erneut bestimmt werden. Die Werte von verdünnten Proben müssen mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert werden.

## 9.4 Interferenzen

Hämolytische, lipämische und ikterische Proben sollten nicht im BI-CAT® ELISA eingesetzt werden.

Nicht angesäuerte Sammelurine nicht verwenden.

## 10 Änderungen

Version \_7 (gültig ab Charge AN129): Assay wird nicht mehr als CE-markiertes IVD verkauft, sondern nur noch zu Forschungswecken (RUO). Weitere Änderungen sind in grau hervorgehoben.

Version \_6 (gültig ab Charge AN122): Gefahrensymbol beim POD Konjugat wurde entfernt. Weitere Änderungen sind in grau hervorgehoben.



## Pipettierschema - Probenvorbereitung

Gleichzeitig für Adrenalin und Noradrenalin in einer Extraktionsplatte

		Standards	Kontrollen	Urin	Plasma	Andere
<b>EX-PLATE:</b>						
CAL 1 – 6	µl	20				
CON 1 & 2	µl		20			
Urin (1:5 verd.)	µl			20		
Plasma	µl				300	
Andere Proben	µl					1 - 300
Dest. Wasser	µl	250	250	250		299 - 0
EX-BUFF	µl	100	100	100	100	100

60 Minuten bei RT mischen

Platte ausleeren und Flüssigkeitsreste ausklopfen

Waschpuffer	µl	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
-------------	----	-------	-------	-------	-------	-------

5 Minuten bei RT vorsichtig schütteln

Platte ausleeren und Flüssigkeitsreste ausklopfen

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

**Sofort** 20 Minuten bei RT mischen

Platte ausleeren und Flüssigkeitsreste ausklopfen

Waschpuffer	µl	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
-------------	----	-------	-------	-------	-------	-------

5 Minuten bei RT vorsichtig schütteln

Platte ausleeren und Flüssigkeitsreste ausklopfen

Waschschritt 2x wiederholen

Platte ausleeren und Flüssigkeitsreste ausklopfen

HCL	µl	100	100	100	100	100
-----	----	-----	-----	-----	-----	-----

Mit **FOIL** abkleben; 20 Minuten bei RT mischen

Enzym mix (frisch)	µl	50	50	50	50	50
--------------------	----	----	----	----	----	----

Mit **FOIL** abkleben; 30 Minuten bei RT mischen

**Platte anschließend nicht ausleeren**

Je **90 µl** in den **Adrenalin** ELISA und je **25 µl** in den **Noradrenalin** ELISA einsetzen

## Pipettierschema - ELISA

Für Adrenalin und Noradrenalin in getrennten Mikrotiterplatten

		Adrenalin (blau) STRIPS-AD			Noradrenalin (gelb) STRIPS-NAD		
		Acylierte			Acylierte		
		Stand.	Kontr.	Proben	Stand.	Kontr.	Proben
Transfer von EX-PLATE zu STRIPS	µl	90	90	90	25	25	25
AS-AD (blau)	µl	30	30	30			
AS-NAD (gelb)	µl				50	50	50

Platten mit FOIL abkleben

10 Sekunden auf dem Horizontalschüttler schütteln  
 15 – 20 Stunden (über Nacht) bei 2 - 8 °C inkubieren  
 Platte ausleeren und Flüssigkeitsreste ausklopfen

Waschpuffer	µl	250	250	250	250	250	250
-------------	----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Platte ausleeren und Flüssigkeitsreste ausklopfen  
 Waschschrift 3x wiederholen  
 Platte ausleeren und Flüssigkeitsreste ausklopfen

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

30 Minuten bei RT schütteln

Platte ausleeren und Flüssigkeitsreste ausklopfen

Waschpuffer	µl	250	250	250	250	250	250
-------------	----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Platte ausleeren und Flüssigkeitsreste ausklopfen  
 Waschschrift 3x wiederholen  
 Platte ausleeren und Flüssigkeitsreste ausklopfen

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

Platte 10 Sekunden schütteln

30 ± 5 Minuten bei RT abgedeckt (Box), ohne schütteln, inkubieren

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

Platte 10 Sekunden schütteln

Messung der Extinktion bei 450 nm (Ref 570 – 650 nm)