



Gebrauchsanweisung

Serotonin High Sensitive ELISA


(Hochsensitiv und für kleine Probenvolumina)


Hochsensitiver Enzymimmunoassay für die
Quantitative Bestimmung von
Serotonin

RUO

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

Inhaltsverzeichnis

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

Verwendete Symbole

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

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

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.
- Vor der Testdurchführung sollte die Gebrauchsanweisung vollständig gelesen und deren Inhalt verstanden worden sein. Die gültige Version aus dem Kit verwenden.
- 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.
- Einzelne Komponenten verschiedener Chargen und Testkits 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.
- Während der Testdurchführung Kittel, Einmal-Handschuhe und Schutzbrille tragen.

- Ein Teil der Komponenten dieses Testbestecks sind kennzeichnungspflichtig. Diese Komponenten tragen das entsprechende Gefahrensymbol auf ihrem Etikett. Weitere Informationen befinden sich in Kapitel 4 Inhalt des Testkits und auf den entsprechenden Sicherheitsdatenblättern.
- 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.
- Abfälle sollten nach den staatlichen und örtlichen Umweltschutzregularien entsorgt werden.
- Zerbrochenes Glas kann zu Verletzungen führen. Vorsicht bei Glasgefäßen.




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

<p>MT-Streifen</p> <p>Mikrotiterstreifen mit je 8 Vertiefungen Einzel abbrechbar</p>	<p>STRIPS</p>	<p>12 Stück</p>
<p>Standard</p> <p>4 ml, Konzentrat, Konzentration: 500 ng/ml Einsatzkonzentrationen werden aus diesem Standard verdünnt (s. auch 6.1.2.)</p>	<p>CAL</p>	<p>1 Flasche</p>
<p>Kontrolle 1 & 2</p> <p>Je 4 ml, Konzentrat Vor dem Einsatz 1:500 verdünnen (s. auch 6.1.3.) Bereich: siehe QC-Zertifikat</p>	<p>CON 1 & 2</p>	<p>2 Flaschen</p>
<p>Acylierungs-Reagenz</p> <p>Lyophilisiert, Inhalt einer Flasche mit 2,5 ml SOLVENT lösen (s. auch 6.1.5.)</p>	<p>ACYL-REAG</p>	<p>4 Flaschen</p>
<p>Acylierungspuffer</p> <p>Lyophilisiert, mit 4 ml destilliertem Wasser lösen, 200 µl Acylierungspufferkonzentrat ACYL-BUFF-CONC (s. auch 6.1.4.)</p>	<p>ACYL-BUFF</p>	<p>1 Flasche</p>
<p>Acylierungspufferkonzentrat</p> <p>1 ml, Konzentrat, gelb eingefärbt</p>	<p>ACYL-BUFF-CONC</p>	<p>1 Flasche</p> <p> Achtung</p>
<p>Deaktivator</p> <p>3 ml, gebrauchsfertig, blau eingefärbt</p>	<p>DEAC</p>	<p>1 Flasche</p> <p> Achtung</p>
<p>Enzymkonjugat</p> <p>12 ml, gebrauchsfertig Anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase</p>	<p>CONJ</p>	<p>1 Flasche</p> <p> Achtung</p>

Waschpuffer 20 ml, Konzentrat Inhalt mit dest. Wasser auf 500 ml auffüllen (s. auch 6.1.6.)	WASH	1 Flasche
Substrat 12 ml TMB Lösung, gebrauchsfertig	SUB	1 Flasche
Stopplösung 12 ml, gebrauchsfertig Enthält 0.3M Schwefelsäure	STOP	1 Flasche
Solvent 12 ml, gebrauchsfertig, enthält Aceton	SOLVENT	1 Flasche  Achtung  Gefahr
Ascorbinsäure 2 ml, gebrauchsfertig Enthält 10%ige Ascorbinsäure	ASC-ACID 10%	1 Flasche
Standardpuffer 50 ml, 10 mM PBS (0,9% NaCl), stabilisiert Muss vor dem Einsatz auf 0,1% Ascorbinsäure angereichert werden (s. auch 6.1.1.)	STD-BUFF	1 Flasche
Reaktionsplatte Für die Acylierung, gebrauchsfertig	ACYL-PLATE	1 Stück
Haftklebefolie gebrauchsfertig	FOIL	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
- Papiertücher, Pipettenspitzen, Stoppuhr

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, s. 6.1.1) stattfinden, so dass jeweils ein Probenvolumen von 20µl 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 **STD-BUFF** + 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 Standards

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:

Std 6	100 pg/sample	990 µl Verdünnungsmedium	+	10 µl CAL
Std 5	20 pg/sample	800 µl Verdünnungsmedium	+	200 µl Std 6
Std 4	6,7 pg/sample	933 µl Verdünnungsmedium	+	67 µl Std 6
Std 3	2 pg/sample	980 µl Verdünnungsmedium	+	20 µl Std 6
Std 2	0,67 pg/sample	993 µl Verdünnungsmedium	+	6,7 µl Std 6
Std 1	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 (s. 6.1.1) geeignet.

Alle als Verdünnungsmedium eingesetzten Puffer müssen zur Stabilisierung 0,1 % Ascorbinsäure enthalten.

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 vorbereitete Standardpuffer (s. 6.1.1) 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 Acylierungsreagenz 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. Plastikschrälchen. 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 große 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 (20 ml, 25x) des Fläschchens **WASH** mit destilliertem Wasser auf 500 ml auffüllen, kurz mischen.

Der fertige 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.

Alle anderen Reagenzien sind gebrauchsfertig.

6.2 Probenvorbereitung (Acylierung)

Reagenzien auf Raumtemperatur bringen. Es wird empfohlen, Doppelbestimmungen anzusetzen.

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

1. Je **25 µl vorbereitete Acylierungspuffer** (s. 6.1.4) in alle zu verwendenden Vertiefungen der Reaktionsplatte **ACYL-PLATE** pipettieren.
2. Je **20 µl verdünnter Standard 1 - 6, Kontrolle 1 & 2 und Probe** in die jeweiligen Vertiefungen pipettieren.

Platte 10 Sekunden auf einem Horizontalschüttler schütteln.

3. Je **10 µl frisch zubereitetes Acylierungsreagenz** (s. 6.1.5) in jede Vertiefung pipettieren (Farbwechsel zu rot) und **sofort** mit dem nächsten Punkt fortfahren.

Solvent ist leicht flüchtig und verdampft schnell. Daher bitte keine Gefäße zusammen mit Mehrkanalpipetten verwenden, da sie eine große 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 bei mittlerer Schüttelfrequenz inkubieren, dabei darf die Platte keinem direkten Sonnenlicht ausgesetzt sein.

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

5. Je **25 µl DEAC** in jede Vertiefung pipettieren.
6. Platte **mit FOIL** abdecken und 3 Stunden bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz 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

1. Je **50 µl acylierte Standards, Kontrollen und Proben** in die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen **STRIPS** pipettieren.
2. Platte mit **FOIL** abdecken. 10 Sekunden auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz schütteln und 15 - 20 Stunden (über Nacht) bei 2 – 8 °C inkubieren.
3. Vertiefungen entleeren, mit ca. **250 µl vorbereiteten Waschpuffer** (s. 6.1.6) 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.
4. Jeweils **100 µl CONJ** in jede Vertiefung pipettieren.
5. 60 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz inkubieren.
6. Waschen: Wie unter Punkt 3. beschrieben.
7. Jeweils **100 µl SUB** in jede Vertiefung pipettieren.
8. 25 ± 5 Minuten bei Raumtemperatur (20 – 25 °C) auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz inkubieren.
9. Jeweils **100 µl STOP** in jede Vertiefung pipettieren. 10 Sekunden auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz schütteln.
10. Streifen innerhalb von 15 Minuten im Mikrotiterplattenphotometer bei einer Messwellenlänge von 450 nm (Referenzwellenlänge zwischen 570 nm und 650 nm) messen.

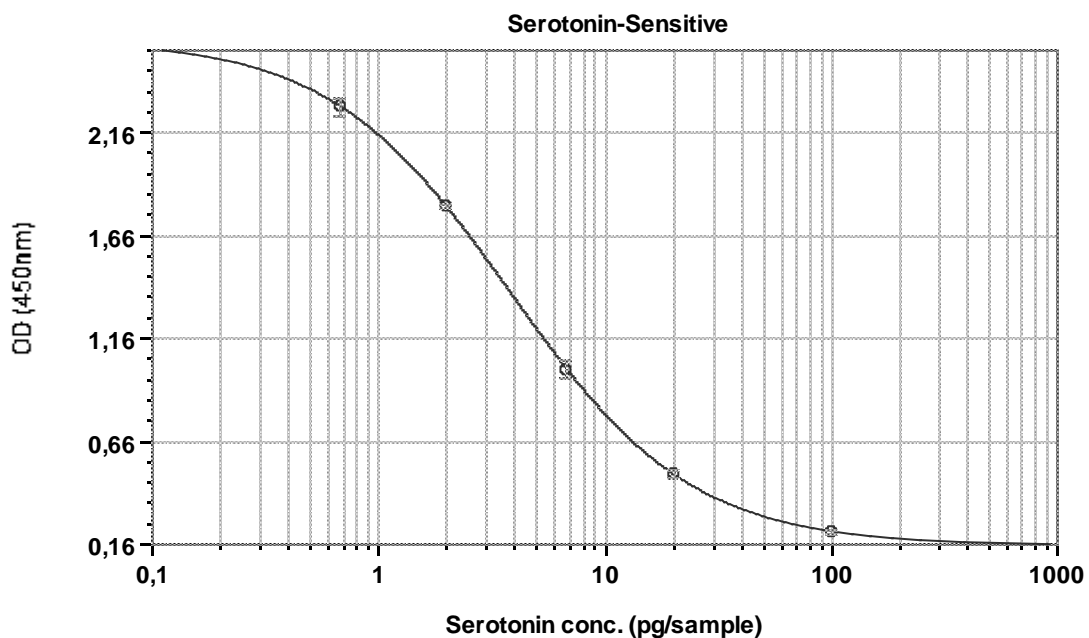
8 Testauswertung

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

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

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 (nicht für die Berechnung der Ergebnisse verwenden).



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

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

Bei einem Probenvolumen von 20 µl, entsprechen 20 pg/sample auch 1 ng/ml (20 pg/20 µl sample). Bei einem Probenvolumen < 20 µl (s. 5), wäre die Konzentration z.B. 20 pg/4 µl sample = 5 ng/ml. Die Standards sind demzufolge: 5 ng/ml (100 pg/sample); 1 ng/ml (20 pg/sample); 0,335 ng/ml (6,7 pg/sample); 0,1 ng/ml (2 pg/sample); 0,0335 ng/ml (0,67 pg/sample).

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

9 Testcharakteristika

9.1 Analytische 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 Analytische 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

9.4 Kalibrierung

Die Kalibrierung erfolgt durch Einwaage der Reinsubstanz.

9.5 Grenzen der Methode

Ergebnisse sind nur für Forschungszwecke geeignet.

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

9.6 Interferenzen

Keine bekannt.

10 Änderungen

Version 8: Änderungen sind in grau hervorgehoben.

Version 7: Änderungen sind in grau hervorgehoben und ab SES119 gültig.

Version 6: Änderungen in Abschnitt 4 sind grau unterlegt.

Version 5: Die Arbeitsanleitung wurde neu formatiert.

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

Pipettierschema Probenvorbereitung

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

Platte 10 Sekunden schütteln

ACYL-REAG (frisch)	µl	10	10	10
--------------------	----	----	----	----

Platte **nicht** abkleben oder zudeckeln, Platte offen schütteln

60 Minuten bei Raumtemperatur schütteln

Direktes Sonnenlicht vermeiden

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

Platte mit FOIL abkleben und 3 Stunden bei Raumtemperatur schütteln

Direktes Sonnenlicht vermeiden

Pipettierschema ELISA

		Acyl. Standards	Acyl. Kontrollen	Acyl. Proben
Transfer von ACYL-PLATE in STRIPS	µl	50	50	50

Platte mit FOIL abkleben, Platte 10 Sekunden schütteln

15 – 20 Stunden (über Nacht) bei 2 - 8 °C inkubieren

4 x Waschen (je 250µl WASH)

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

60 Minuten bei Raumtemperatur schütteln

4 x Waschen (je 250µl WASH)

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

25 ± 5 Minuten bei Raumtemperatur schütteln

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

Platte 10 Sekunden schütteln, Messung der Extinktion bei 450 nm