



Gebrauchsanweisung

Noradrenaline High Sensitive ELISA

(Hochsensitiv und für kleine Probenvolumina)


Enzymimmunoassay für die
Quantitative Bestimmung von
Noradrenalin


RUO

Nur für Forschungszwecke

REF EA633/96

 96










 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	Testprinzip	3
2	Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen.....	4
3	Lagerung und Haltbarkeit.....	5
4	Inhalt des Testkits	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	18
	Pipettierschema – Probenvorbereitung	19
	Pipettierschema – ELISA.....	20

Verwendete Symbole

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

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

1 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.
- Vor der Testdurchführung sollte die Gebrauchsanweisung vollständig gelesen und deren Inhalt verstanden worden sein. Die gültige Version aus dem Kit verwenden.
- Alle Reagenzien dieses Testkits, 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 Patientenproben sind die gängigen Laborsicherheitsrichtlinien und die Gute Laborpraxis zu beachten.
- Während der Testdurchführung Kittel, Einmal-Handschuhe und Schutzbrille tragen.
- Ein Teil der Komponenten dieses Testkits 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.
- Einige Komponenten enthalten geringe Mengen Natriumazid als Konservierungsmittel. Vermeiden Sie die Bildung von Schwermetallaziden im Abflusssystem, indem Sie reichlich mit Wasser nachspülen.
- 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 Testkits

4.1 Reagenzien für die Probenvorbereitung

Extraktionsplatte

EX-PLATE

2 Stück

48 Vertiefungen

Beschichtet mit Boronat-Affinitätsgel

Extraktions-Puffer

EX-BUFF

2 Fläschchen

6 ml, gebrauchsfertig

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:**

<p>Kontrolle 1 & 2 Je 4 ml gebrauchsfertig Konzentrationen: siehe Q.C.-Zertifikat</p>	CON 1 & 2		2 Fläschchen
<p>Acylierungs-Reagenz 6 ml, gebrauchsfertig Enthält DMSO und DMF Bitte beachten: Lösungsmittel reagieren mit vielen Plastikmaterialien, z.B. Plastiksälchen. Sie reagieren nicht mit normalen Pipettenspitzen und Glasgefäßen.</p>	ACYL-REAG		1 Fläschchen
			Gefahr
			Achtung
<p>Acylierungs-Puffer 20 ml, gebrauchsfertig</p>	ACYL-BUFF		1 Fläschchen
<p>Enzym Je 2 ml/Fläschchen, lyophilisiert Catechol-O-Methyltransferase</p>	ENZYME		3 Fläschchen
<p>Coenzym 1 ml, gebrauchsfertig S-Adenosyl-L-Methionin</p>	COENZYME		1 Fläschchen
<p>Enzym-Puffer 3,5 ml, gebrauchsfertig</p>	ENZYME-BUFF		1 Fläschchen
			Achtung
<p>Enzymplatte 96 Vertiefungen, einzeln abbrechbar</p>	ENZYME-PLATE		1 Stück
<p>Proben-Stabilisator 20 ml, gebrauchsfertig</p>	STABILIZER		1 Fläschchen
			Achtung

4.2 Reagenzien für den ELISA

Noradrenalin-Antiserum 2,5 ml, gebrauchsfertig, vom Kaninchen gelb gefärbt	AS-NAD		1 Fläschchen Achtung
MT-Streifen Mikrotiterstreifen mit je 8 Kavitäten, einzeln abbrechbar Vorbeschichtet mit: Noradrenalin	STRIPS-NAD		12 Stück
Enzymkonjugat 12 ml, gebrauchsfertig Anti-Kaninchen IgG-Peroxidase	CONJ		1 Fläschchen Achtung
Waschpuffer 20 ml, Konzentrat Inhalt mit dest. Wasser auf 500 ml auffüllen	WASH		2 Fläschchen
Substrat 12 ml TMB Lösung, gebrauchsfertig	SUB		1 Fläschchen
Stopplösung 12 ml, gebrauchsfertig Enthält 0.3M Schwefelsäure	STOP		1 Fläschchen
Haftklebefolie gebrauchsfertig	FOIL		10 Stück

Zusätzliches Material (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
- Papiertücher, Pipettenspitzen, Stoppuhr
- 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.:

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 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.

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 ≤ 5 besitzen, dürfen nicht zusätzlich mit dem Proben-Stabilisator **STABILIZER angereichert werden und müssen unmittelbar nach der Gewinnung eingefroren werden.**

5.3 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 übersteigen könnten. Während des ersten Schrittes der Extraktion muss ein pH-Wert ≥ 7 eingehalten werden. Dieses kann ggf. auch durch schrittweise Zugabe von zusätzlichem Extraktions-Puffer **EX-BUFF** ausgeglichen werden (50 µl-Schritte).

Angesäuerte Proben, die bereits einen pH-Wert ≤ 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

6.1.1 Waschpuffers

Inhalt (20ml) des Waschpufferkonzentrates (25x) **WASH** mit destilliertem Wasser auf ein Endvolumen von 500 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 Enzymmixes

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 einer saugfähigen Unterlage (Papiertuch) entfernen.
5. Je **1 ml Waschpuffer** **WASH** (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 (Papiertuch) 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 (Papiertuch) entfernen.
11. Je **1 ml Waschpuffer** **WASH** (s. 6.1.1) 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 einer saugfähigen Unterlage (Papiertuch) entfernen.
13. Waschvorgang aus Punkt 11. und 12. einmal wiederholen.
14. Je **125 µl Salzsäure** **HCL** zur Elution des **Noradrenalins** in jede Vertiefung pipettieren.
15. Platte mit Haftklebefolie **FOIL** 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.
17. Je **20 µl des frisch vorbereiteten Enzymmixes** (s. 6.1.2) in jede Vertiefung der Enzymplatte pipettieren. **Die entstehenden Rotfärbungen zeigen die bereits pipettierten Vertiefungen an.**
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!
Vom Überstand werden je 100 µl im ELISA eingesetzt.

7 Testdurchführung ELISA

1. Je **100 µl vorbereitete Standards, Kontrollen und Proben** in die entsprechenden Vertiefungen der Mikrotiterstreifen **STRIPS-NAD** übertragen.
2. Je **20 µl Noradrenalin-Antiserum AS-NAD** (gelb gefärbt) in jede Vertiefung 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** (s. 6.1.1) füllen und wieder entleeren. Anschließend die Mikrotiterstreifen umgedreht auf eine saugfähige Unterlage (Papiertuch) legen und kurz ausklopfen, um alle Flüssigkeitsreste zu entfernen. Diesen Vorgang 3 mal wiederholen.
5. Je **100 µl Enzymkonjugat 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. **40 ± 5** Minuten bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
10. Je **100 µl Stopplösung STOP** in jede Vertiefung pipettieren. **Für 10 Sekunden auf dem 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 einer Software 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.

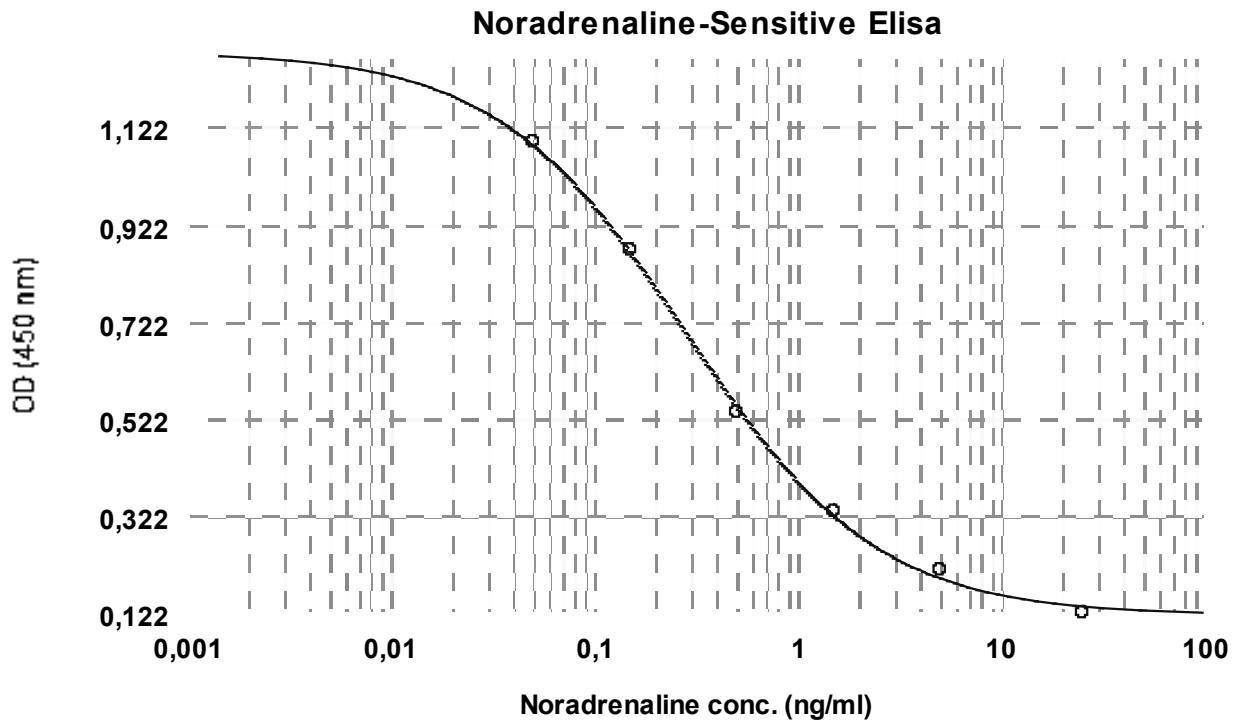
$$\text{Volumenfaktor} = 300 \mu\text{l} / 20 \mu\text{l} = 15$$

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

Umrechnung in pmol/l:

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

Beispiel einer Standardkurve (nicht für die Berechnung der Ergebnisse verwenden):



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

	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>D</u>	<u>R²</u>
Std (Standards: Concentration vs MeanValue)	1,277	0,929	0,286	0,117	0,999

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. Die Nachweisgrenze ist abhängig vom Probenvolumen und kann mit dem entsprechenden Volumenfaktor (s. 8. Auswertung) berechnet werden:

	Noradrenalin
Sensitivität:	$\frac{15 \text{ pg/ml (89 pmol/l)}}{\text{Volumenfaktor}}$
Beispiel für 300 µl Probe (Volumenfaktor 15):	$\frac{15 \text{ pg/ml}}{15} = 1,0 \text{ pg/ml (5,9 pmol/l)}$

9.2 Analytische Spezifität (Kreuzreaktivitäten)

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

Substanz	Kreuzreaktivität (%) Noradrenalin-Ak
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

9.5 Kalibrierung

Die Kalibrierung erfolgt durch Einwaage der Reinsubstanz.

9.6 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.

9.7 Interferenzen

Siehe Probengewinnung und –lagerung.

10 Änderungen

Version _10: Änderungen sind grau hervorgehoben.

Version _9: In Abschnitt 4 wurde das Gefahrensymbol „Achtung“ bei AS-NAD und CONJ ergänzt. Weitere Ergänzungen/Änderungen sind grau hervorgehoben.

Version _8: In Abschnitt 4 wurde das Gefahrensymbol „Achtung“ beim POD Konjugat entfernt, da nicht mehr notwendig.

Pipettierschema – Probenvorbereitung

		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	µl	1000	1000	1000
------	----	------	------	------

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	µl	1000	1000	1000
------	----	------	------	------

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

		Acyl.Standards	Acyl.Kontrollen	Acyl. 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
Je **100 µl** in den ELISA einsetzen

Pipettierschema – ELISA

		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
 Platte ausleeren

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
 Platte ausleeren

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

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

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

40 ± 5 Minuten bei Raumtemperatur schütteln

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

Platte 10 Sekunden schütteln
 Messung der Extinktion bei 450 nm innerhalb von 15 Minuten
 (Ref. zw. 570 nm und 650 nm)