



Arbeitsanleitung

1-Methylhistamin ELISA

Enzymimmunoassay für die quantitative Bestimmung von 1-Methylhistamin (N-Methylhistamin) in Urin und für Forschungszwecke in Plasma und Zellkultur



REF EA208/96

 12 x 8

 2 – 8 °C

 DLD Gesellschaft für Diagnostika und medizinische Geräte mbH
Adlerhorst 15 • 22459 Hamburg • Germany • Tel: +49 40 5558710 • Fax: +49 40 55587111
Internet: <http://www.dld-diagnostika.de> • E-Mail: contact@dld-diagnostika.de

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Testprinzip	Seite 5
2. Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen	Seite 6
3. Lagerung und Haltbarkeit	Seite 6
4. Inhalt des Testbestecks	Seite 7
5. Probengewinnung	Seite 9
6. Vorbereitung der Reagenzien	Seite 10
7. Testdurchführung Urinproben	Seite 11
8. Testdurchführung Plasma- und Zellkulturproben	Seite 13
9. Auswertung	Seite 16
10. Testcharakteristika	Seite 18
Pipettierschema Urinproben	Seite 23
Pipettierschema Plasma- und Zellkulturproben	Seite 24

Verwendete Symbole

 IVD	In-Vitro-Diagnostikum		CE markiert
 CONT	Inhalt		Verwendbar bis
 LOT	Chargenbezeichnung		Temperaturbegrenzung
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
 REF	Bestellnummer		Gebrauchsanweisung beachten

Gefahrensymbole



Gefahr



Achtung

1. Einleitung und Testprinzip

Histamin (Nomenklatur: 2-(4-Imidazolyl)-ethylamin) ist ein Naturstoff, der im menschlichen und tierischen Organismus weit verbreitet ist. Es ist gut wasserlöslich und hat einen basischen Charakter.

Histamin gehört biochemisch zu den biogenen Aminen und wird aus der Aminosäure Histidin gebildet. Diese Decarboxylierung erfolgt mit Hilfe des Enzyms Histidindecarboxylase.

Die Biosynthese des Histamins findet in den Mastzellen, Zellen der Epidermis und der Magenschleimhaut und in den Nervenzellen statt.

Aus Mastzellen und basophilen Granulozyten kann das Histamin explosionsartig freigesetzt werden und zwar bei der Stimulation der Speicherzellen mit dem entsprechenden Allergen. Diese Stimulation erfolgt durch die Bindung des Allergens an die spezifischen IgE-Antikörper auf der Oberfläche der Zielzellen.

Wobei dieser Effekt noch nicht bei dem ersten Kontakt mit einem Allergen auftritt. Zunächst erfolgt durch den Erstkontakt die Bildung von Plasmazellen, die spezifische IgE-Antikörper produzieren und freisetzen. Diese binden an die entsprechenden Rezeptoren der Mastzellen (Sensibilisierung). Erst beim nächsten Allergen-Kontakt können die Allergene direkt an die IgE-Antikörper der Mastzellen binden und damit wird die spontane Histaminausschüttung aus der Granula der Mastzellen ausgelöst (allergische Sofortreaktion).

Zirkulierendes Histamin wird durch die Histamin-N-Methyltransferase schnell zu 1-Methylhistamin (N-Methylhistamin) umgesetzt. Die Ausscheidung erfolgt im Urin und dadurch ist die Bestimmung dieses Metaboliten im Urin von Interesse.

Der 1-Methylhistamin-ELISA-Kit enthält Reagenzien für die quantitative Bestimmung von derivatisiertem 1-Methylhistamin in Urin-, Plasma- und Zellkulturproben. Die Derivatisierung erfolgt während der Probenvorbereitung. Dabei wird 1-Methylhistamin durch das Acylierungsreagenz quantitativ in N-Acyl-1-Methylhistamin umgewandelt.

Der 1-Methylhistamin-ELISA ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay. An die Festphase gebundenes und freies, in Lösung befindliches Antigen 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 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

- Dieser Kit ist lediglich zum in vitro-Gebrauch bestimmt.
- 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. 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 Testbestecks

4.1 **MT-Streifen** **STRIPS** 12 Streifen
Mikrotiterstreifen mit je 8 Kavitäten, einzeln abbrechbar
beschichtet mit 1-Methylhistamin

4.2 **Standards 1 - 6** **CAL 1 - 6** 6 Fläschchen
Je 4 ml, gebrauchsfertig

Konzentrationen:

Standard:		1	2	3	4	5	6
1-Methylhistamin	ng / ml	0	10	30	100	300	1000
	nmol / l	0	80	240	800	240	8000

4.3 **Kontrolle 1 & 2** **CON 1 & 2** 2 Fläschchen
Je 4 ml, gebrauchsfertig
Bereich: Siehe Q.C.-Zertifikat im Kit

4.4 **Acylierungsreagenz** **ACYL-REAG** 3 Fläschchen
lyophilisiert, Inhalt eines Fläschchens
mit 1,5 ml **SOLVENT** lösen und gegebenenfalls
vereinigen (s. auch 6.1.2)

4.5 **Lösungsmittel** **SOLVENT** 1 Fläschchen
5,5 ml Lösungsmittel
für das Acylierungsreagenz
Enthält Aceton und DMSO



Gefahr



Achtung

4.6 **Antiserum** **AS** 1 Fläschchen
5,5 ml, gebrauchsfertig, blau gefärbt
Kaninchen-anti-N-Acyl-1-Methylhistamin

4.7 **Enzymkonjugat** **CONJ** 1 Fläschchen
12 ml, gebrauchsfertig
Anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase

4.8 **Waschpuffer** **WASH** 1 Fläschchen
20 ml, Konzentrat
Inhalt jedes Fläschchens mit destilliertem Wasser
auf 500 ml auffüllen.

4.9	Substrat 12 ml TMB-Lösung, gebrauchsfertig	SUB	1 Fläschchen
4.10	Stopplösung 12 ml, gebrauchsfertig Enthält 0,3 M Schwefelsäure	STOP	1 Fläschchen
4.11	Reaktionsplatte für die Acylierung	ACYL-PLATE	1 Stück
4.12	Ausgleichsreagenz lyophilisiert, mit 20,5 ml DILUENT lösen (s. auch 6.1.1) vorsichtig mischen, übermäßige Schaumbildung vermeiden	EQUA-REAG	1 Fläschchen
4.13	Diluent 20,5 ml, Diluent für das Ausgleichsreagenz, gebrauchsfertig	DILUENT	1 Fläschchen
4.14	Startpuffer 6 ml, gebrauchsfertig	START-BUFF	1 Fläschchen
4.15	Haftklebefolie Gebrauchsfertig	FOIL	1 Stück

Weiter werden benötigt (nicht im Kit enthalten):

- Pipetten für 20, 50, 100, 200 µl und Multipipette
- Mehrkanalpipette oder Waschgerät
- Schüttler (horizontal)
- Photometer für die Messung von Mikrotiterplatten (450 nm)
- Destilliertes Wasser

5. Probengewinnung

Urin

Es kann sowohl Spontanurin als auch Sammelurin verwendet werden.

Sammelurin: Der gesamte Urin, der während einer Periode von 24 Stunden ausgeschieden wird, wird in einem Behälter, der 10 - 15 ml 6N 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.

Wiederholtes Einfrieren und Wiederauftauen sollte vermieden werden.

Plasma

Für den Test sollte EDTA-Plasma eingesetzt werden. Hämolytische und insbesondere lipämische Proben sollten im Assay nicht verwendet werden. Proben, die nicht sofort in dem Test eingesetzt werden, können bei -20 °C bis zu 6 Monaten gelagert werden.

Wiederholtes Einfrieren und Wiederauftauen sollte vermieden werden.

6. Vorbereitung der Reagenzien

6.1.1 Ausgleichsreagenz **EQUA-REAG**

Zum Lösen den Inhalt des Fläschchens **DILUENT** komplett hinzufügen, kurz mischen und 30 min auf einen Horizontal-Schüttler oder Rollmischer legen. Vorsichtig mischen, übermäßige Schaumbildung vermeiden.

Das gelöste Ausgleichsreagenz muss für den späteren Gebrauch bei -20 °C eingefroren werden und bleibt so für mindestens 1 Jahr verwendbar.

6.1.2 Acylierungsreagenz **ACYL-REAG**

Das Acylierungsreagenz sollte unmittelbar vor Gebrauch frisch angesetzt werden. Nach Gebrauch ist das Restreagenz zu verwerfen.

Inhalt des Fläschchens in je 1,5 ml **SOLVENT** lösen und für 5 min auf einen Horizontal-Schüttler oder Rollmischer legen.

Durch die drei Flaschen im Kit ist der ELISA in drei Ansätzen teilbar. Falls 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 hohe Oberfläche besitzen. Bitte Multipetten o.ä. verwenden, das aufgelöste Acylierungsreagenz direkt aus dem Fläschchen aufziehen und Vertiefung für Vertiefung pipettieren.

6.1.3 Waschpuffer **WASH**

Inhalt des Fläschchens 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.

7. Testdurchführung Urinproben

7.1 Probenvorbereitung Urinproben (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 20 µl Standard 1 - 6, Kontrolle 1 & 2 und Urinproben in die jeweiligen Vertiefungen der im Kit enthaltenen Reaktionsplatte pipettieren.
2. Je 200 µl Ausgleichsreagenz (s. 6.1.1) in alle Vertiefungen pipettieren.
3. Je 20 µl frisch angesetztes Acylierungsreagenz (s. 6.1.2) in alle Vertiefungen pipettieren und sofort mit Punkt 4. fortfahren.

Farbe wechselt zu rot!

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 hohe Oberfläche besitzen. Bitte Multipetten o.ä. verwenden, das aufgelöste Acylierungsreagenz direkt aus dem Fläschrhen aufziehen und Vertiefung für Vertiefung pipettieren.

4. Reaktionsplatte 60 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschrüttler bei mittlerer Schrüttelfrequenz mischen. Platte nicht abkleben oder zudeckeln, Platte offen schrütteln.

Jeweils 20 µl der so vorbereiteten Proben werden im ELISA eingesetzt.

7.2 ELISA Urinproben

Die Reagenzien auf Raumtemperatur bringen.

1. 50 μ l Startpuffer in die entsprechenden Vertiefungen der Mikrotiterstreifen pipettieren.
2. 20 μ l vorbereitete Standards 1 bis 6, Kontrollen und Urinproben in die entsprechenden Vertiefungen der Mikrotiterstreifen pipettieren.
Farbe wechselt zu rot.
3. 50 μ l Antiserum in die entsprechenden Vertiefungen der Mikrotiterstreifen pipettieren.
4. 30 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
Platte nicht abkleben oder zudeckeln, Platte offen schütteln.
5. Vertiefungen entleeren, mit ca. 250 μ l 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 4 mal durchführen.
6. Jeweils 100 μ l Enzymkonjugat in alle Vertiefungen pipettieren.
7. 20 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
8. Waschen: Wie unter Punkt 5. beschrieben.
9. Jeweils 100 μ l Substrat in alle Vertiefungen pipettieren.
10. 15 bis 20 Minuten bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
11. Jeweils 100 μ l Stopplösung in alle Vertiefungen pipettieren.
12. Streifen im Mikrotiterplattenphotometer bei einer Messwellenlänge von 450 nm innerhalb 15 Minuten (Referenzwellenlänge zwischen 570 nm und 650 nm) messen.

8. Testdurchführung Plasma- und Zellkulturproben (Sensitive Variante)

8.1 Probenvorbereitung Plasma- und Zellkulturproben (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!

Die mitgelieferten Standards und Kontrollen müssen unmittelbar vor jeder Verwendung mit dest. Wasser 1:50 auf die angegebenen Konzentrationen verdünnt werden:

	Konzentration	Vol. dest. Wasser	Vol. Kit Std
Std 1	0 ng/ml	1000 µl	/
Std 2	0,2 ng/ml	980 µl	20 µl CAL 2 (10 ng/ml)
Std 3	0,6 ng/ml	980 µl	20 µl CAL 3 (30 ng/ml)
Std 4	2 ng/ml	980 µl	20 µl CAL 4 (100 ng/ml)
Std 5	6 ng/ml	980 µl	20 µl CAL 5 (300 ng/ml)
Std 6	20 ng/ml	980 µl	20 µl CAL 6 (1000 ng/ml)
Kontrolle 1	/	980 µl	20 µl CON 1
Kontrolle 2	/	980 µl	20 µl CON 2

Diese Verdünnungen sollten in Polypropylen(PP)röhrchen, in Eppendorf Cups bzw. Reaktionsgefäßen aus PP erfolgen.

Die Plasmen bzw. Zellkulturproben werden unverdünnt eingesetzt.

1. Je 50 µl verdünnter Standard 1 - 6, verdünnte Kontrolle 1 & 2 und Plasma- und Zellkulturproben in die jeweiligen Vertiefungen der im Kit enthaltenen Reaktionsplatte pipettieren.
2. Je 100 µl Ausgleichsreagenz (s. 6.1.1) in alle Vertiefungen pipettieren.
3. Je 10 µl frisch angesetztes Acylierungsreagenz (s. 6.1.2) in alle Vertiefungen pipettieren und sofort mit Punkt 4. fortfahren.
Farbe wechselt zu rot!
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 hohe Oberfläche besitzen. Bitte Multipetten o.ä. verwenden, das aufgelöste Acylierungsreagenz direkt aus dem Fläschrhen aufziehen und Vertiefung für Vertiefung pipettieren.
4. Reaktionsplatte 60 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschrüttler bei mittlerer Schrüttelfrequenz mischen.
Platte nicht abkleben oder zudeckeln, Platte offen schrütteln.

Jeweils 50 µl der so vorbereiteten Proben werden im ELISA eingesetzt.

8.2 ELISA Plasma- und Zellkulturproben

Die Reagenzien auf Raumtemperatur bringen.

1. 50 µl Startpuffer in die entsprechenden Vertiefungen der Mikrotiterstreifen pipettieren.
2. 50 µl vorbereitete Standards 1 bis 6, Kontrollen und Plasma- und Zellkulturproben in die entsprechenden Vertiefungen der Mikrotiterstreifen pipettieren.
Farbe wechselt zu rot.
3. 20 µl Antiserum in die entsprechenden Vertiefungen der Mikrotiterstreifen pipettieren.
4. Platte mit Haftklebefolie abdecken. Kurz auf dem Horizontalschüttler mischen und 15 - 20 Stunden (über Nacht) bei 2 - 6 °C inkubieren.
5. Vertiefungen entleeren, mit ca. 250 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 4 mal durchführen.
6. Jeweils 100 µl Enzymkonjugat in alle Vertiefungen pipettieren.
7. 20 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
8. Waschen: Wie unter Punkt 5. beschrieben.
9. Jeweils 100 µl Substrat in alle Vertiefungen pipettieren.
10. 15 bis 20 Minuten bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
11. Jeweils 100 µl Stopplösung in alle Vertiefungen pipettieren.
12. Streifen im Mikrotiterplattenphotometer bei einer Messwellenlänge von 450 nm innerhalb 15 Minuten (Referenzwellenlänge zwischen 570 nm und 650 nm) messen.

9. Auswertung

9.1 Auswertung Urinproben

Die OD-Werte der Standards (linear) werden gegen die entsprechenden Konzentrationen der Standards (10 / 30 / 100 / 300 / 1000 ng/ml) (logarithmisch) aufgetragen.

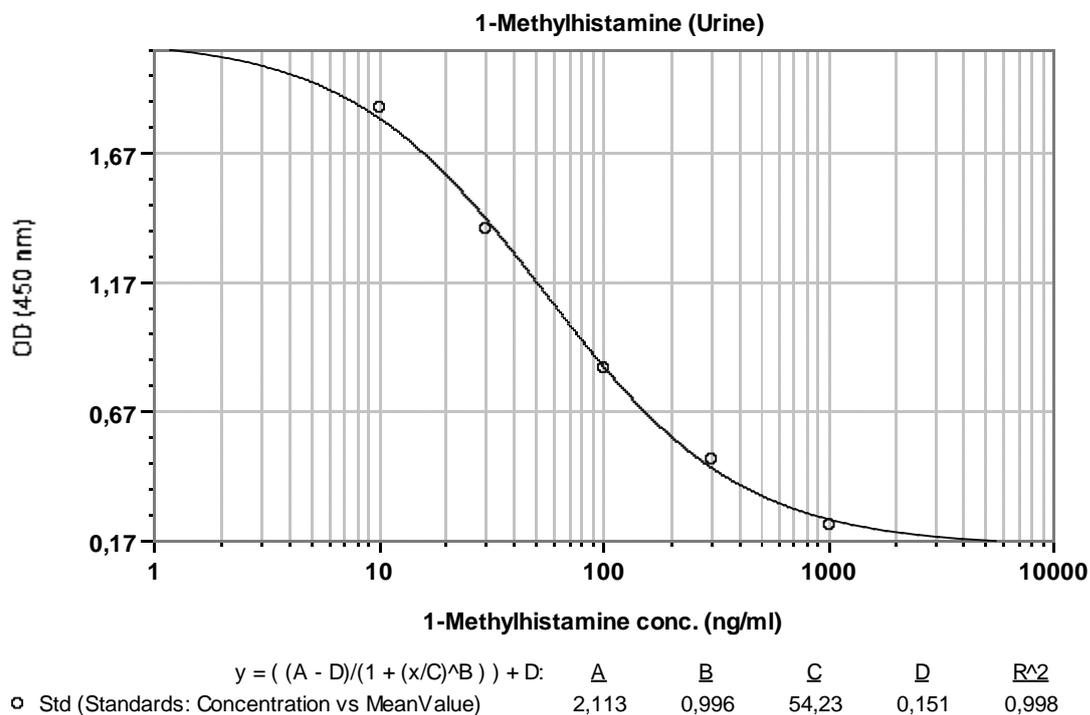
Bei Verwendung eines Computerprogramms wird die 4-Parameter-Analyse empfohlen. Alternativ kann auch die Cubic-Spline-Methode oder die Logit-Log-Berechnung verwendet werden.

Die Konzentrationen der Kontrollen und Urinproben können dann direkt aus der Standardkurve in ng/ml abgelesen werden.

Umrechnung:

1-Methylhistamin: 1 ng / ml = 8,0 nmol / l

Die folgende Abbildung zeigt ein typisches Beispiel einer Standardkurve:



9.2 Auswertung Plasma- und Zellkulturproben

Die OD-Werte der Standards (linear) werden gegen die entsprechenden Konzentrationen der verdünnten Standards (0,2 / 0,6 / 2 / 6 / 20 ng/ml) (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.

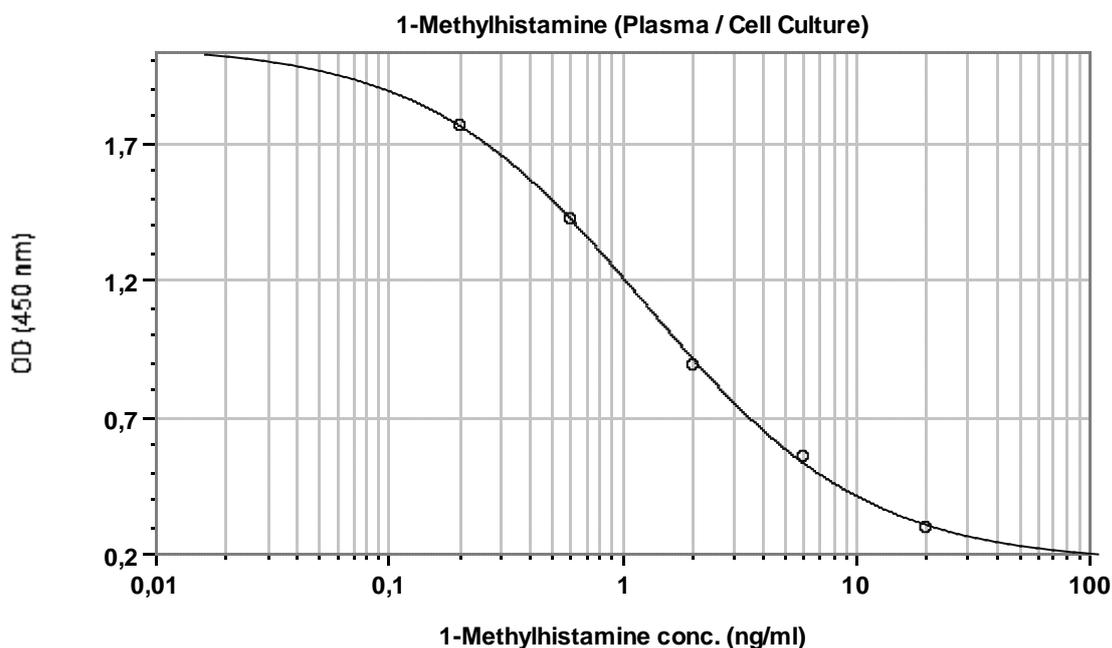
Die Konzentrationen der Plasma- und Zellkulturproben können dann direkt aus der Standardkurve in ng/ml abgelesen werden.

Die Konzentrationen der Kontrollen müssen mit Faktor 50 multipliziert werden.

Umrechnung:

1-Methylhistamin: 1 ng / ml = 8,0 nmol / l

Die folgende Abbildung zeigt ein typisches Beispiel einer Standardkurve:



$y = ((A - D)/(1 + (x/C)^B)) + D$: A B C D R²
 ○ Std (Standards: Concentration vs MeanValue) 2,056 0,922 1,243 0,17 1

10. Testcharakteristika

10.1 Referenzbereich

Der angegebene Referenzbereich gilt lediglich als Richtlinie. Es wird empfohlen, dass jedes Labor seinen eigenen Referenzbereich erstellt.

Urin
< 130 ng/ml

10.2 Sensitivität

Die untere Nachweisgrenze wurde bestimmt, indem die 3-fache Standardabweichung der OD des Nullstandards gemessen und die entsprechende Konzentration an der Standardkurve abgelesen wurde:

Urin	Plasma /
2,5 ng/ml	0,13 ng/ml

10.3 Spezifität (Kreuzreaktivitäten)

Der in dem Test verwendete Antikörper ist spezifisch für 1-Methylhistamin. Getestet wurden die Kreuzreaktivitäten zu Histamin, 3-Methylhistamin, Imidazol-4-essigsäure, L-Histidin, Tryptamin, Tyramin.

Substanz	Kreuzreaktivität
1-Methylhistamin	100
Histamin	0,39
3-Methylhistamin	0,014
Imidazol-4-essigsäure	< 0,006
L-Histidin	< 0,005
Tryptamin	< 0,005
Tyramin	< 0,005

10.4 Wiederfindung

Unterschiedliche Mengen an 1-Methylhistamin wurden zu einer Urinprobe, zu einer Plasmaprobe und zu den Zellkulturmedien DMEM und RPMI 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 ng/ml

Urin

zugesezt	gemessen	erwartet	% Wiederfindung
0	18,6		
9,7	32,1	28,3	114
18,8	40,0	37,4	107
38,5	73,7	57,1	129
56,6	93,7	75,2	125
74,1	110,0	92,7	119
90,9	96,8	109,5	88
143	156,1	161,5	97
188	174,4	206,1	85
231	274,5	249,4	110
273	291,7	291,3	100
385	433,7	403,2	108
476	542,7	494,8	110
566	647,8	584,6	111

Mittlere Wiederfindung: 108

Plasma

zugesezt	gemessen	erwartet	% Wiederfindung
0,00	0,55		
0,29	0,77	0,84	92
0,74	1,29	1,29	100
1,43	2,14	1,98	108
2,31	2,87	2,86	101
4,76	5,05	5,31	95
9,09	7,99	9,64	83

Mittlere Wiederfindung: 96

DMEM

zugesezt	gemessen	erwartet	% Wiederfindung
0,00	0,66		
0,29	0,83	0,95	87
0,74	1,38	1,40	99
1,43	2,47	2,09	118
2,31	3,30	2,97	111
4,76	6,20	5,42	114
9,09	11,05	9,75	113

Mittlere Wiederfindung: 107

RPMI

zugesezt	gemessen	erwartet	% Wiederfindung
0,00	0,53		
0,29	0,81	0,82	98
0,74	1,41	1,27	110
1,43	2,35	1,96	120
2,31	3,31	2,84	116
4,76	5,58	5,29	105
9,09	11,61	9,62	121

Mittlere Wiederfindung: 112

10.5 Linearität Urinproben

Die Linearität des ELISAs wurde durch Verdünnen einer Urinprobe mit CAL 1 bestimmt.

Konzentrationsangaben in ng/ml

Verdünnung	Messwert	errechneter Ausgangswert	% Wiederfindung
orig.	241,4		
4+1	204,4	193,1	106
3+1	188,6	181,5	104
2+1	158,0	160,9	98
1+1	137,2	120,7	114
1+2	82,1	80,5	102
1+3	66,2	60,3	110
1+4	49,6	48,3	103
1+5	41,2	40,2	103
1+7	32,8	30,2	109
1+9	26,9	24,1	111

Mittlere Linearität: 106

10.6 Reproduzierbarkeit

Die Reproduzierbarkeit der ELISA-Methode wurde durch die Ermittlung der Intra-Assay-Variationskoeffizienten gezeigt. Hierfür wurden zwei unterschiedliche Urinproben, eine EDTA-Plasma- und eine Zellkulturprobe (RPMI) eingesetzt.

Konzentrationsangaben in ng/ml

Urin

Probe	Anzahl n	Mittelwert	SD	VK (%)
Urin 1	40	33,97	2,07	6,1
Urin 2	40	113,95	8,68	7,6

Plasma

Probe	Anzahl n	Mittelwert	SD	VK (%)
Plasma	40	0,957	0,087	9,1

Zellkultur

Probe	Anzahl n	Mittelwert	SD	VK (%)
RPMI	40	0,990	0,070	7,1

10.7 Korrelation des 1-Methylhistamin-ELISAs zur LCMS

Gemessen wurden ausschließlich Urinproben.

$$Y = 0,94 \times \text{LCMS} + 6,5$$

$$R = 0,968 \quad N = 16$$

Pipettierschema Urinproben

Probenvorbereitung Urinproben (Acylierung)

		Standard	Kontrolle	Urinprobe
Standard 1 - 6	µl	20		
Kontrolle 1 & 2	µl		20	
Urinprobe	µl			20
Ausgleichsreagenz	µl	200	200	200
frisch angesetztes Acylierungsreagenz	µl	20	20	20

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

Jeweils **20 µl** im ELISA einsetzen

ELISA Urinproben

		Standard	Kontrolle	Urinprobe
Startpuffer	µl	50	50	50
Acyl. Standard 1 - 6	µl	20		
Acyl. Kontrolle 1 & 2	µl		20	
Acyl. Urinprobe	µl			20
Antiserum	µl	50	50	50

Platte 30 Minuten bei Raumtemperatur schütteln
 Platte **nicht** abkleben oder zudeckeln, Platte offen schütteln.

4 x Waschen

Enzymkonjugat	µl	100	100	100
---------------	----	-----	-----	-----

20 Minuten bei Raumtemperatur schütteln

4 x Waschen

Substrat	µl	100	100	100
----------	----	-----	-----	-----

15 - 20 Minuten bei Raumtemperatur schütteln

Stopplösung	µl	100	100	100
-------------	----	-----	-----	-----

Messung der Extinktion bei 450 nm

Pipettierschema Plasma- und Zellkulturproben

Probenvorbereitung Plasma- und Zellkulturproben (Acylierung)

		Standard	Kontrolle	Probe
Standard 1 - 6 (1:50)	µl	50		
Kontrolle 1 & 2 (1:50)	µl		50	
Probe	µl			50
Ausgleichsreagenz	µl	100	100	100
frisch angesetztes Acylierungsreagenz	µl	10	10	10

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

Jeweils **50 µl** im ELISA einsetzen

ELISA Plasma- und Zellkulturproben

		Standard	Kontrolle	Probe
Startpuffer	µl	50	50	50
Acyl. Standard 1 - 6	µl	50		
Acyl. Kontrolle 1 & 2	µl		50	
Acyl. Probe	µl			50
Antiserum	µl	20	20	20

Platte mit Folie abkleben. Kurz auf dem Horizontal-Schüttler mischen.
 15 – 20 Stunden (über Nacht) bei 2 - 6 °C inkubieren

4 x Waschen

Enzymkonjugat	µl	100	100	100
---------------	----	-----	-----	-----

20 Minuten bei Raumtemperatur schütteln

4 x Waschen

Substrat	µl	100	100	100
----------	----	-----	-----	-----

15 - 20 Minuten bei Raumtemperatur schütteln

Stopplösung	µl	100	100	100
-------------	----	-----	-----	-----

Messung der Extinktion bei 450 nm