



Arbeitsanleitung

Dopamin ELISA

Enzymimmunoassay

für die quantitative Bestimmung von

Dopamin

in Plasma und Urin

CE

IVD

REF EA608/96

 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. Einführung und Testprinzip	Seite	5
2. Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen	Seite	6
3. Lagerung und Haltbarkeit	Seite	6
4. Inhalt des Testbestecks	Seite	6
5. Probengewinnung und -lagerung	Seite	9
6. Vorbereitung der Reagenzien und Proben	Seite	10
7. Testdurchführung ELISA	Seite	13
8. Auswertung	Seite	14
9. Testcharakteristika	Seite	15
Pipettierschema Probenvorbereitung	Seite	19
Pipettierschema ELISA	Seite	20

Verwendete Symbole

 In-Vitro-Diagnostikum

 Inhalt

 Chargenbezeichnung

 Hersteller

 Bestellnummer

 CE markiert

 Verwendbar bis

 Temperaturbegrenzung

 Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen

 Gebrauchsanweisung beachten

Gefahrensymbole

 Gefahr

 Achtung

1. Einführung und Testprinzip

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.

Eine vermehrte Bildung von Catecholaminen findet man bei Tumoren des chromaffinen Systems (Phäochromozytom, Neuroblastom, Ganglioneurom). Außerdem findet man erhöhte oder erniedrigte Catecholaminwerte bei Hypertonie, degenerativen Erkrankungen des Herzens, Schizophrenie und der manisch-depressiven Erkrankung. Bei Kindern mit Verdacht auf ein Neuroblastom ist die Bestimmung von Dopamin und seiner Derivate von besonderer diagnostischer Bedeutung.

Der Dopamin-ELISA-Kit enthält Reagenzien für die quantitative Bestimmung von Dopamin in Plasma und Urin.

Dopamin wird mittels eines cis-Diol-spezifischen Boronat-Affinitätsgels extrahiert, acyliert und anschließend enzymatisch in N-Acyl-3-Methoxytyramin umgewandelt.

Der Dopamin-ELISA ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay. Dopamin ist an die Festphase der Mikrotiterplatte gebunden. Acyliertes Dopamin aus der Probe und an die Festphase gebundenes Dopamin 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 Dopamins in der Probe.

2. Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

- Dieser Kit ist lediglich zum in vitro-Gebrauch bestimmt.
- Während der Testdurchführung Einmal-Handschuhe tragen.
- Einige der Reagenzien enthalten als Konservierungsmittel Natriumazid. Verschlucken und Berühren mit der Haut vermeiden.
- 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

Reagenzien für die Probenvorbereitung:

4.1	Extraktionsplatte 48 Vertiefungen beschichtet mit Boronat-Affinitäts-gel	EX-PLATE	2 Stück
4.2.	Extraktions-Puffer 6 ml, gebrauchsfertig violett gefärbt	EX-BUFF	1 Fläschchen
4.3	Salzsäure 21 ml, gebrauchsfertig 0,025 M HCl Gelb/orange gefärbt	HCL	1 Fläschchen

4.4 Standards (1 - 7)**CAL 1 - 7**

7 Fläschchen

Je 4 ml, gebrauchsfertig

Konzentrationen:

Standard	1	2	3	4	5	6	7
Dopamine (ng/ml)	0	1.5	10	40	160	640	2,560
Dopamine (nmol/l)	0	9.8	65.3	261	1,045	4,179	16,717

Falls nur Urine bestimmt werden sollen, kann Standard 2 weggelassen werden.

Falls nur Plasmen bestimmt werden sollen, kann Standard 7 weggelassen werden.

4.5 Kontrolle 1 & 2**CON 1 & 2**

2 Fläschchen

Je 4 ml, gebrauchsfertig

Konzentrationen: Siehe Q.C.-Zertifikat

4.6 Acylierungs-Reagenz**ACYL-REAG**

1 Fläschchen

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.



Gefahr, Achtung

4.7 Acylierungs-Puffer**ACYL-BUFF**

1 Fläschchen

20 ml, gebrauchsfertig
violett gefärbt

4.8 Enzym**ENZYME**

3 Fläschchen

1,7 ml/Fläschchen, lyophilisiert
Catechol-O-Methyltransferase

4.9 Coenzym**COENZYME**

1 Fläschchen

1 ml, gebrauchsfertig
S-Adenosyl-L-Methionin

4.10 Enzym-Puffer**ENZYME-BUFF**

1 Fläschchen

3,5 ml, gebrauchsfertig



Achtung

Reagenzien für den ELISA:

- | | | | |
|------|--|--|--------------|
| 4.11 | Dopamin-Antiserum
5,5 ml, gebrauchsfertig, vom Kaninchen
grün gefärbt | AS-DA | 1 Fläschchen |
| 4.12 | MT-Streifen
Mikrotiterstreifen mit je 8 Kavitäten, einzeln abbrechbar
vorbeschichtet mit Dopamin, grün markiert | STRIPS-DA | 12 Stück |
| 4.13 | POD-Konjugat
Je 12 ml, gebrauchsfertig
Anti-Kaninchen IgG-POD Konjugat | CONJ | 1 Fläschchen |
| | |  | Achtung |
| 4.14 | Waschpuffer
20 ml, Konzentrat
Inhalt mit bidest. Wasser auf 500 ml auffüllen | WASH | 1 Fläschchen |
| 4.15 | Substrat
12 ml TMB-Lösung, gebrauchsfertig | SUB | 1 Fläschchen |
| | |  | Gefahr |
| 4.16 | Stopplösung
12 ml, gebrauchsfertig
Enthält 0,3M Schwefelsäure | STOP | 1 Fläschchen |
| 4.17 | Haftklebefolie
Gebrauchsfertig | FOIL | 10 Stück |

Weiter werden benötigt (nicht im Kit enthalten)

- Pipetten (15, 20, 50, 120, 300, 700 µl)
- Multipipetten für 10, 20, 50, 100, 150, 200, 250, 250 µl und 1 ml
- Schüttler (horizontal)
- Waschgerät
- Photometer für die Messung von Mikrotiterplatten
- Destilliertes Wasser

5. Probengewinnung und -lagerung

Plasma

Für den Test sollte EDTA-Plasma eingesetzt werden. Bei der Blutentnahme müssen bestimmte Vorsichtsmaßnahmen beachtet werden, da durch psychische und physische Belastungen des Patienten die Konzentration der Catecholamine stark ansteigen kann. Es empfiehlt sich, dass der Patient mit liegender Kanüle ruht und die Blutentnahme erst 20 - 30 Minuten nach Venenpunktion erfolgt.

Hämolytische und insbesondere lipämische Plasmen sollten im Assay nicht eingesetzt werden, da sie zu falsch niedrigen Werten führen können.

Das Plasma kann bis zu 6 Stunden bei 2 -8 °C gelagert werden. Proben, die nicht sofort in dem Test eingesetzt werden, können bei -20 °C bis zu 1 Woche gelagert werden.

Urin

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.

6. Vorbereitung der Reagenzien und Proben

6.1. Vorbereitung der Reagenzien

6.1.1. Vorbereitung des Waschpuffers

Inhalt jedes Fläschchens mit destilliertem Wasser auf 500 ml auffüllen. Der verdünnte Waschpuffer muss für den späteren Gebrauch bei 2 - 8 °C gelagert werden und bleibt so für 4 Wochen verwendbar.

6.1.2. Vorbereitung des 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 1,7 ml destilliertem Wasser auflösen. Anschließend 0,3 ml **COENZYME** und 0,7 ml **ENZYME-BUFF** dazu pipettieren (Endvolumen 2,7 ml) und gut mischen.

Durch die drei Flaschen Enzym im Kit ist der ELISA in drei Ansätzen teilbar. Falls der Kit in einem Ansatz komplett verbraucht werden soll, wird nur ein Fläschchen mit frisch hergestelltem Enzymmix benötigt.

6.2. Probenvorbereitung

Alle Reagenzien auf Raumtemperatur bringen.

Es wird empfohlen Doppelbestimmungen durchzuführen.

Es werden je 20 µl Standards, Kontrollen und Urinproben extrahiert.

Es werden je 300 µl Plasmaproben extrahiert.

1. Je 20 µl Standard 1 - 7, je 20 µl Kontrolle 1 & 2, je 20 µl Urin-Probe in die entsprechende Vertiefung der Extraktionsplatte pipettieren. Zu den Standards, Kontrollen und Urinproben je 250 µl bidestilliertes Wasser zum Volumenausgleich hinzugeben.
Je 300 µl Plasma-Probe in die entsprechenden Vertiefungen pipettieren (kein Volumenausgleich erforderlich).
2. Je 50 µl Extraktions-Puffer in alle Vertiefungen pipettieren.
3. Platte 60 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Orbitalschüttler bei 400-600 U/min inkubieren.
4. Die Platte ausleeren und Flüssigkeitsreste durch kräftiges Ausklopfen auf einer saugfähigen Unterlage (Papierhandtuch) entfernen.
5. Je 1 ml Waschpuffer in alle Vertiefungen pipettieren und 5 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Orbitalschüttler bei niedriger Schüttelfrequenz inkubieren.
6. Die Platte ausleeren und Flüssigkeitsreste durch kräftiges Ausklopfen auf einer saugfähigen Unterlage (Papierhandtuch) entfernen.
7. Je 150 µl Acylierungs-Puffer in alle Vertiefungen pipettieren.
8. Je 50 µl Acylierungs-Reagenz in alle Vertiefungen pipettieren und sofort mit Punkt 9. 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 Orbitalschüttler bei 400-600 U/min inkubieren.
10. Die Platte ausleeren und Flüssigkeitsreste durch kräftiges Ausklopfen auf einer saugfähigen Unterlage (Papierhandtuch) entfernen.
11. Je 1 ml Waschpuffer in alle Vertiefungen pipettieren und 5 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Orbitalschüttler bei niedriger Schüttelfrequenz inkubieren.

12. Die Platte ausleeren und Flüssigkeitsreste durch kräftiges Ausklopfen auf einer saugfähigen Unterlage (Papierhandtuch) entfernen.
13. Waschvorgang aus Punkt 11. und 12. einmal wiederholen.
14. Je 200 μ l Salzsäure (0,025 M) zur Elution der Catecholamine in alle Vertiefungen pipettieren.
15. Platte mit Haftklebefolie abdecken und 20 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Orbitalschüttler bei 400-600 U/min inkubieren.

Vorsicht: Überstand anschließend nicht ausleeren!

Vom Überstand werden je 50 μ l im Dopamin-ELISA eingesetzt.

7. Testdurchführung ELISA

Alle Reagenzien auf Raumtemperatur bringen. Es wird empfohlen, Doppelbestimmungen durchzuführen.

1. Je 10 µl des frisch vorbereiteten Enzymmixes in alle Vertiefungen der Mikrotiterstreifen (grün markiert) pipettieren.
2. Je 50 µl vorbereitete Standards, Kontrollen und Patientenproben in die entsprechenden Vertiefungen der Mikrotiterstreifen (grün markiert) pipettieren.
3. Platte mit Folie abdecken und 30 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Orbitalschüttler inkubieren (400 - 600 U/min).
4. Je 50 µl Dopamin-Antiserum (grün gefärbt) in alle Vertiefungen pipettieren.
5. Platte mit Folie abdecken. Kurz auf dem Orbitalschüttler mischen und 12 - 20 Stunden (über Nacht) bei 2 - 8 °C inkubieren.
6. 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.
7. Je 100 µl POD-Konjugat in alle Vertiefungen pipettieren.
8. 30 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Orbitalschüttler inkubieren (400 - 600 U/min).
9. Waschen: Wie unter Punkt 6. beschrieben.
10. Je 100 µl Substrat in alle Vertiefungen pipettieren.
11. 25 bis 35 Minuten bei Raumtemperatur (20 – 25°C) auf einem Orbitalschüttler inkubieren (400 -600 U/min)..
12. Je 100 µl Stopplösung in alle Vertiefungen pipettieren.
13. Streifen sofort (innerhalb 10 Minuten) im Mikrotiterplattenphotometer bei einer Messwellenlänge von 450 nm (Referenzwellenlänge zwischen 570 nm und 650 nm) messen.

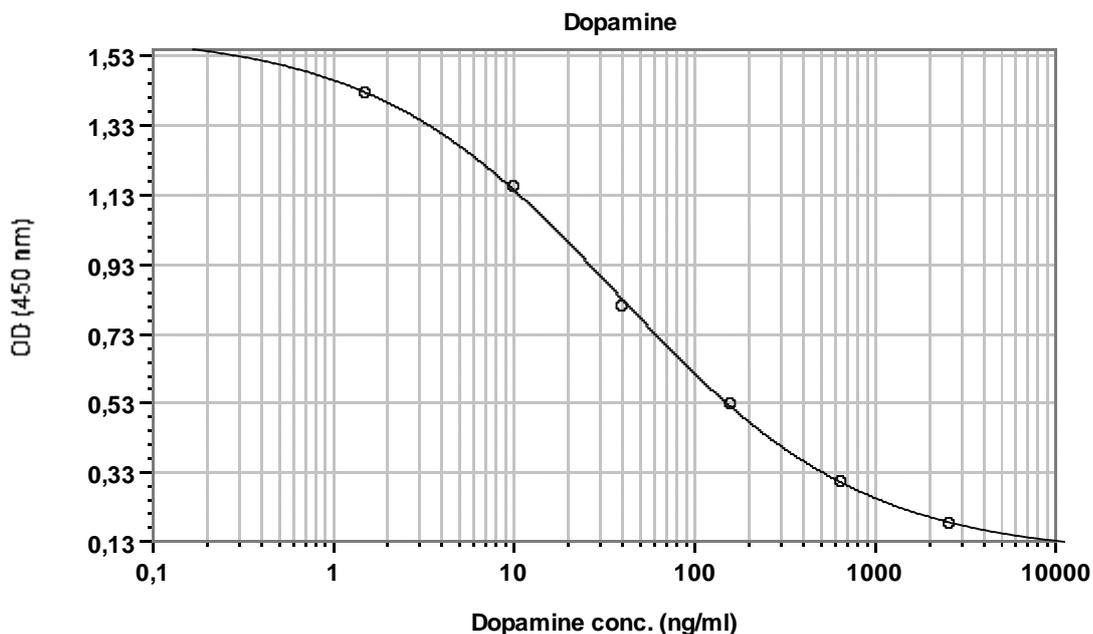
8. Auswertung

Die OD-Werte der Standards (linear) werden gegen die entsprechenden Konzentrationen der Standards (logarithmisch) aufgetragen. Die Konzentrationen der Patientenproben können dann direkt aus der Standardkurve in ng/ml abgelesen werden.

Die abgelesenen Konzentrationen der Urinproben und der Kontrollen können ohne weitere Umrechnung übernommen werden.

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.

8.1. Typisches Beispiel



$y = ((A - D)/(1 + (x/C)^B)) + D$: A B C D R²
 ○ Std (Standards: Concentration vs MeanValue) 1,596 0,64 37,141 0,091 1

9. Testcharakteristika

9.1. Referenzbereiche

Die angegebenen Referenzbereiche gelten lediglich als Richtlinie. Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen Referenzbereiche erstellt.

Dopamin

Urin	< 600 µg/Tag
Plasma	< 100 pg/ml

9.2. 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.

Dopamin

Sensitivität (Urin):	0,44 ng/ml
Sensitivität (Plasma):	29 pg/ml

9.3. Spezifität (Kreuzreaktivitäten)

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

Substanz	Kreuzreaktivität (%) Dopamin-Ak
Adrenalin	< 0,020
Noradrenalin	0,23
Dopamin	100
Metanephrin	< 0,020
Normetanephrin	< 0,020
3-Methoxytyramin	0,28
L-Dopa	< 0,01
Tyramin	0,011
Tyrosin	< 0,01
Homovanillinsäure	< 0,01
Vanillinmandelsäure	< 0,01

9.4. Wiederfindung

Unterschiedliche Mengen an Dopamin wurden zu einer EDTA-Plasma- bzw. Urinprobe 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				Plasma			
zugesetzt	gemessen	erwartet	Wdf (%)	zugesetzt	gemessen	erwartet	Wdf (%)
0,00	26,8			0,00	0,14		
9,1	30,4	35,9	85	0,32	0,43	0,47	92
20,6	48,5	47,5	102	0,78	0,87	0,93	94
32,4	52,1	59,2	88	1,17	1,14	1,31	87
51,0	88,6	77,9	114	1,54	1,33	1,68	79
98,5	129,4	125,3	103	1,90	1,93	2,05	94
167,5	204,3	194,3	105	3,65	2,99	3,79	79
390,5	377,1	417,4	90	6,65	5,77	6,79	85
		Mittelwert:	96			Mittelwert:	84

9.5. Linearität

Die Linearität des ELISAs wurde durch Verdünnung einer aufgestockten Plasma- bzw. Urinprobe bestimmt.

Konzentrationsangaben in ng/ml

Urin				Plasma			
Verdünnung	Messwert	Extrapolierter Ausgangswert	Wdf (%)	Verdünnung	Messwert	Extrapolierter Ausgangswert	Wdf (%)
Orig.	480,2			Orig.	11,8		
1+1	243,7	240,1	102	1+1	5,98	5,90	101
1+2	148,7	160,1	93	1+2	3,97	3,94	101
1+4	108,9	96,0	113	1+4	2,78	2,36	118
1+9	47,1	48,0	98	1+9	1,45	1,18	123
1+14	33,1	32,0	103	1+14	0,89	0,79	114
		Mittelwert:	102			Mittelwert:	111

9.6. Reproduzierbarkeit

9.6.1. Intra-Assay

Die Reproduzierbarkeit der ELISA-Methode wurde durch die Ermittlung des Intra-Assay-Variationskoeffizienten gezeigt.

Konzentrationsangaben in ng/ml

Probe	Anzahl n	Mittelwert	SD	VK (%)
1	40	25,1	2,84	11,3
2	40	146	11,6	7,9

Pipettierschema Probenvorbereitung

		Standards	Kontrollen	Urin	Plasma
Standard 1 - 7	µl	20			
Kontrolle 1&2	µl		20		
Patient Urin	µl			20	
Patient Plasma	µl				300
Dest. Wasser	µl	250	250	250	
Extraktions-Puffer	µl	50	50	50	50

60 Minuten bei RT inkubieren (Schütteln: 400 - 600 U/min)

Platte ausleeren und Flüssigkeitsreste ausklopfen

Waschpuffer	ml	1	1	1	1
-------------	----	---	---	---	---

5 Minuten bei RT inkubieren (leichtes Schütteln)

Platte ausleeren und Flüssigkeitsreste ausklopfen

Acyl.-Puffer	µl	150	150	150	150
Acyl.-Reagenz	µl	50	50	50	50

Sofort 20 Minuten bei RT schütteln (400 - 600 U/min)

Platte ausleeren und Flüssigkeitsreste ausklopfen

Waschpuffer	ml	1	1	1	1
-------------	----	---	---	---	---

5 Minuten bei RT inkubieren (leichtes Schütteln)

Platte ausleeren und Flüssigkeitsreste ausklopfen

Waschpuffer	ml	1	1	1	1
-------------	----	---	---	---	---

5 Minuten bei RT inkubieren (leichtes Schütteln)

Platte ausleeren und Flüssigkeitsreste ausklopfen

HCl	µl	200	200	200	200
-----	----	-----	-----	-----	-----

20 Minuten mit Folie bei RT inkubieren (Schütteln: 400 - 600 U/min)

Platte anschließend nicht ausleeren

für den ELISA je 50 µl einsetzen

Pipettierschema - ELISA

	Standards	Kontrollen	Proben
--	-----------	------------	--------

Dopamin (grün):				
Enzymmix (frisch)	µl	10	10	10
Standard 1 – 7	µl	50		
Kontrollen 1&2	µl		50	
Proben	µl			50
Dopamin Antiserum	µl	50	50	50

Platte mit Folie abkleben
 Kurz auf dem Orbitalschüttler mischen und für
 12 – 20 Stunden (über Nacht) bei 2 - 8 °C inkubieren

4 x waschen

POD-Konjugat	µl	100	100	100
--------------	----	-----	-----	-----

30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren (Schütteln: 400 - 600 U/min)

4 x waschen

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

25 - 35 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren (Schütteln: 400 - 600 U/min)

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

Messung der Extinktion bei 450 nm