





Arbeitsanleitung


Dopamin High Sensitive ELISA

Enzymimmunoassay
für die quantitative Bestimmung von
Dopamin

REF EA634/96

 12 x 8











 2 – 8 °C

 DLD Gesellschaft für Diagnostika und medizinische Geräte mbH
Adlerhorst 15 • 22459 Hamburg • Tel 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	11
7. Testdurchführung ELISA	Seite	14
8. Auswertung	Seite	15
9. Testcharakteristika	Seite	17
Pipettierschema Probenvorbereitung	Seite	19
Pipettierschema ELISA	Seite	20

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. 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.

Der Dopamin-Sensitive ELISA-Kit enthält Reagenzien für die quantitative Bestimmung von Dopamin in niedrigkonzentrierten Proben bzw. für kleine Probenvolumina.

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

Der Dopamin-Sensitive 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-Affinitätsgel	EX-PLATE	2 Stück
4.2.	Extraktions-Puffer 6 ml, gebrauchsfertig violett gefärbt	EX-BUFF	2 Fläschchen
4.3	Salzsäure 21 ml, gebrauchsfertig 0,025 M HCl Gelb/orange gefärbt	HCL	1 Fläschchen

- 4.4 **Standards (A - F)** **CAL A - F** 6 Fläschchen
 Je 4 ml, gebrauchsfertig,
 Konzentrationen:

Standard	A	B	C	D	E	F
Dopamin (ng/ml)	0	0,3	1,25	5	20	100
Dopamin (nmol/l)	0	2,0	8,2	32,7	131	653

- 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



Achtung



Gefahr

Bitte beachten: Lösungsmittel reagieren mit vielen Plastikmaterialien,
 z.B. Plastikschrälchen. Sie reagieren nicht mit normalen Pipettenspitzen
 und Glasgefäßen.

- 4.7 **Acylierungs-Puffer** **ACYL-BUFF** 1 Fläschchen
 20 ml, gebrauchsfertig, violett gefärbt

- 4.8 **Enzym** **ENZYME** 3 Fläschchen
 2 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

- 4.11 **Enzymplatte** **ENZYME-PLATE** 1 Stück
 96 Vertiefungen,
 einzeln abbrechbar

- 4.12 **Proben-Stabilisator** **STABILIZER** 1 Fläschchen
 20 ml, gebrauchsfertig

Reagenzien für den ELISA:

4.13	Dopamin-Antiserum 2,5 ml, gebrauchsfertig, vom Kaninchen grün gefärbt	AS-DA	1 Fläschchen
4.14	MT-Streifen Mikrotiterstreifen mit je 8 Kavitäten, einzeln abbrechbar vorbeschichtet mit: Dopamin, grün markiert	STRIPS-DA	12 Stück
4.15	POD-Konjugat 12 ml, gebrauchsfertig Anti-Kaninchen IgG-POD Konjugat	CONJ	1 Fläschchen
4.16	Waschpuffer 20 ml, Konzentrat Inhalt mit bidest. Wasser auf 500 ml auffüllen	WASH	2 Fläschchen
4.17	Substrat 12 ml TMB-Lösung, gebrauchsfertig	SUB	1 Fläschchen
4.18	Stopplösung 12 ml, gebrauchsfertig Enthält 0,3M Schwefelsäure	STOP	1 Fläschchen
4.19	Haftklebefolie Gebrauchsfertig	FOIL	10 Stück

Weiter werden benötigt (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
- Evtl. Wärmeschrank (37°C)

5. Probengewinnung und -lagerung

5.1 Plasma

Für den Test kann 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 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 (maximal 20% des Probenvolumens), z.B.:

Probenvolumen	Stabilisatorvolumen
20 µl	4 µl
50 µl	10 µl
100 µl	20 µl
200 µl	40 µl
300 µl	60 µl
500 µl	100 µl

5.2 Zellkulturproben und allgemein biologische Proben

Die Lagerung und Stabilität dieser Proben ist vom Probentyp und 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 (maximal 10% des Probenvolumens), z.B.:

Probenvolumen	Stabilisatorvolumen
20 µl	2 µl
50 µl	5 µl
100 µl	10 µl
200 µl	20 µl
300 µl	30 µl
500 µl	50 µl

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

5.3 Gewebehomogenate

Gewebehomogenate können in 0,01 N HCl in Anwesenheit von 0,15 mM EDTA und 4 mM Natriumdisulfit homogenisiert werden.

Weitere Grundsätze für die Probengewinnung müssen berücksichtigt werden:

1. 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 ausgeglichen werden (50µl Schritte).
Angesäuerte Proben, die bereits einen pH-Wert ≤ 5 besitzen dürfen nicht zusätzlich mit dem Proben-Stabilisator angereichert werden.
2. 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

Waschpuffer

Inhalt eines 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.

Enzymmix

! 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 dazupipettieren (Endvolumen 3 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, ist die Verwendung eines Fläschchens ausreichend.

Alle anderen Reagenzien sind gebrauchsfertig.

6.2 Probenvorbereitung

Alle Reagenzien auf Raumtemperatur bringen.

Es wird empfohlen Doppelbestimmungen durchzuführen.

Es werden je 20 µl Standard extrahiert.

Es werden je 1 - 300 µl Probe extrahiert (alternativ auch > 300 µl bis 500 µl)

1. Je 20 µl Standard A - F, je 20 µl Kontrolle 1 & 2, je 1 - 300 µl Probe in die entsprechende Vertiefung der Extraktionsplatte pipettieren.
Zum Volumenausgleich die Standards, Kontrollen und Proben mit destilliertem Wasser auf 300 µl auffüllen, d.h. 20 µl Standard bzw. Kontrolle + je 280 µl destilliertes Wasser und z.B. 100 µl Probe + 200 µl destilliertes Wasser.

Bei Probenvolumina > 300 µl bis 500 µl ist auf 500 µl mit destilliertem Wasser aufzufüllen. Innerhalb eines Testansatzes kann aber nur eine Volumenvariante (300 µl oder 500 µl) durchgeführt werden.

2. Je 100 µl Extraktions-Puffer in alle Vertiefungen pipettieren.
3. Platte mit Haftklebefolie 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 (Papierhandtuch) entfernen.
5. Je 1 ml Waschpuffer in alle Vertiefungen 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 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. Plastikschälchen. Sie reagieren nicht mit normalen Pipetten-spitzen 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 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 (Papierhandtuch) entfernen.
13. Waschvorgang aus Punkt 11. und 12. einmal wiederholen.
14. Je 125 µl Salzsäure zur Elution des Dopamins in alle Vertiefungen pipettieren.
15. Platte mit Haftklebefolie abdecken und 20 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
Vorsicht: Überstand anschließend nicht ausleeren!
16. Je 100 µl in die entsprechenden Vertiefungen der Enzymplatte übertragen.
17. Je 20 µl des frisch vorbereiteten Enzymmixes (s. 6.1.2) in alle Vertiefungen der Enzymplatte pipettieren. Die entstehenden Rotfärbungen zeigen die bereits pipettierten Vertiefungen an.
18. Enzymplatte mit Haftklebefolie 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 (grün markiert) übertragen.
2. Je 20 µl Dopamin-Antiserum (grün gefärbt) in alle Vertiefungen pipettieren.
3. Platte mit Haftklebefolie abdecken. Kurz auf dem Horizontal-schüttler mischen und 15 - 20 Stunden (über Nacht) bei 2 - 6 °C inkubieren.
4. 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.
5. Je 100 µl POD-Konjugat in alle Vertiefungen 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 in alle Vertiefungen pipettieren.
9. 35 bis 45 Minuten bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
10. Je 100 µl Stopplösung in alle Vertiefungen pipettieren.
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 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.

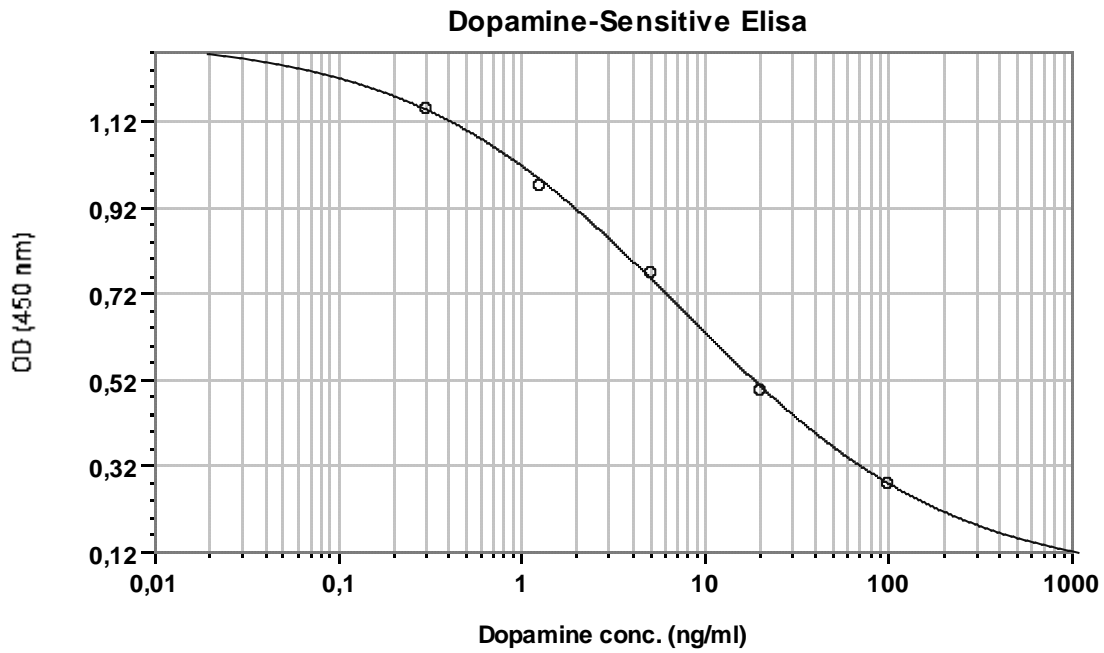
Volumenfaktor = 300 µl / 20 µl = 15

Konzentration der Probe = 0,6 ng/ml / 15 = 0,040 ng/ml = 40 pg/ml

Umrechnung in pmol / l:

Dopamin: 1 pg / ml = 6,53 pmol / l

Typisches Beispiel



$y = ((A - D)/(1 + (x/C)^B)) + D$: A B C D R²
 ○ Std (Standards: Concentration vs MeanValue) 1,313 0,587 7,325 0,056 0,999

9. Testcharakteristika

9.1 Referenzbereiche

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

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

Sensitivität:	$\frac{89 \text{ pg/ml (581 pmol/l)}}{\text{Volumenfaktor}}$
Beispiel für 300 µl Probe (Volumenfaktor 15):	$\frac{89 \text{ pg/ml}}{15} = 5,9 \text{ pg/ml (39 pmol/l)}$

9.3 Spezifität (Kreuzreaktivitäten)

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

Substanz	Kreuzreaktivität (%)
Dopamin	100
Adrenalin	< 0,020
Noradrenalin	0,23
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-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			
zugesetzt	gemessen	erwartet	Wdf (%)	zugesetzt	gemessen	erwartet	Wdf (%)
0,0	26,6			0,0	30,6		
13,4	35,4	40,0	88	13,4	35,3	44,0	80
21,7	44,7	48,3	92	21,7	47,6	52,3	91
37,9	63,7	64,5	99	37,9	62,7	68,5	92
56,0	70,8	82,6	86	56,0	74,1	86,6	86
151,5	157,0	178,1	88	151,5	167,0	182,1	92
223,9	173,3	250,5	69	223,9	223,5	254,5	88
294,1	297,5	320,7	93	294,1	273,5	324,7	84
307,7	289,8	334,3	87	307,7	281,5	338,3	83
606,1	615,3	632,7	97	606,1	632,1	636,7	99
		Mittelwert:	89			Mittelwert:	88

9.5 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	289	23,7	8,2
Zellkulturmedium	24	235	30,1	12,8

Pipettierschema - Probenvorbereitung

		Standards	Kontrollen	Probe
Standard A - F	µl	20		
Kontrolle 1 & 2	µl		20	
Probe	µl			1 - 300
Dest. Wasser	µl	280	280	auf 300 auffüllen
Extraktions-Puffer	µl	100	100	100

Platten mit Folie abkleben; 60 Minuten bei RT schütteln

Platte ausleeren und Flüssigkeitsreste ausklopfen

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

5 Minuten bei RT vorsichtig schütteln

Platte ausleeren und Flüssigkeitsreste ausklopfen

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

Sofort 20 Minuten bei RT schütteln

Platte ausleeren und Flüssigkeitsreste ausklopfen

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

5 Minuten bei RT vorsichtig schütteln

Platte ausleeren und Flüssigkeitsreste ausklopfen

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

5 Minuten bei RT vorsichtig schütteln

Platte ausleeren und Flüssigkeitsreste ausklopfen

HCl	µl	125	125	125
-----	----	-----	-----	-----

Platten mit Folie abkleben; 20 Minuten bei RT schütteln

Platte anschließend nicht ausleeren

Übertrag Enzymplatte	µl	100	100	100
----------------------	----	-----	-----	-----

Enzymmix (frisch)	µl	20	20	20
-------------------	----	----	----	----

Platten mit Folie 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

	Standards	Kontrollen	Proben
Dopamin (grün):			
Standard A - F μl	100		
Kontrollen 1 & 2 μl		100	
Proben μl			100
Dopamin Antiserum	20	20	20

Platte mit Folie abkleben
Kurz auf dem Horizontalschüttler mischen und für
15 – 20 Stunden (über Nacht) bei 2 - 6 °C inkubieren

4 x waschen

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

60 Minuten bei Raumtemperatur schütteln

4 x waschen

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

35 - 45 Minuten bei Raumtemperatur schütteln

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

Messung der Extinktion bei 450 nm