



## 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](mailto: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><br>Prüfungen |
|  REF  | Bestellnummer         |  | Gebrauchsanweisung beachten             |

### Gefahrensymbole



Gefahr



Achtung



## 1. Einführung und Testprinzip

Catecholamine ist die Bezeichnung für eine Gruppe von aromatischen Amininen (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  | <b>Extraktionsplatte</b><br>48 Vertiefungen<br>beschichtet mit Boronat-Affinitätsgel | <b>EX-PLATE</b> | 2 Stück      |
| 4.2. | <b>Extraktions-Puffer</b><br>6 ml, gebrauchsfertig<br>violett gefärbt                | <b>EX-BUFF</b>  | 2 Fläschchen |
| 4.3  | <b>Salzsäure</b><br>21 ml, gebrauchsfertig<br>0,025 M HCl<br>Gelb/orange gefärbt     | <b>HCL</b>      | 1 Fläschchen |

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

| Standard                | A | B   | C    | D    | E   | F   |
|-------------------------|---|-----|------|------|-----|-----|
| <b>Dopamin</b> (ng/ml)  | 0 | 0,3 | 1,25 | 5    | 20  | 100 |
| <b>Dopamin</b> (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 | <b>Dopamin-Antiserum</b><br>2,5 ml, gebrauchsfertig, vom Kaninchen<br>grün gefärbt   | <b>AS-DA</b>     | 1 Fläschchen |
| 4.14 | <b>MT-Streifen</b><br>Mikrotiterstreifen mit je 8 Kavitäten, einzeln abbrechbar<br>vorbeschichtet mit:<br>Dopamin, grün markiert | <b>STRIPS-DA</b> | 12 Stück     |
| 4.15 | <b>POD-Konjugat</b><br>12 ml, gebrauchsfertig<br>Anti-Kaninchen IgG-POD Konjugat   | <b>CONJ</b>      | 1 Fläschchen |
| 4.16 | <b>Waschpuffer</b><br>20 ml, Konzentrat<br>Inhalt mit bidest. Wasser auf 500 ml auffüllen  | <b>WASH</b>      | 2 Fläschchen |
| 4.17 | <b>Substrat</b><br>12 ml TMB-Lösung, gebrauchsfertig   | <b>SUB</b>       | 1 Fläschchen |
| 4.18 | <b>Stopplösung</b><br>12 ml, gebrauchsfertig<br>Enthält 0,3M Schwefelsäure   | <b>STOP</b>      | 1 Fläschchen |
| 4.19 | <b>Haftklebefolie</b><br>Gebrauchsfertig   | <b>FOIL</b>      | 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  $\leq 5$  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  $\geq 7$  eingehalten werden. Dieses kann ggf. auch durch schrittweise Zugabe von zusätzlichem Extraktions-Puffer ausgeglichen werden (50µl Schritte).  
Angesäuerte Proben, die bereits einen pH-Wert  $\leq 5$  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. Plastikschrälchen. 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.

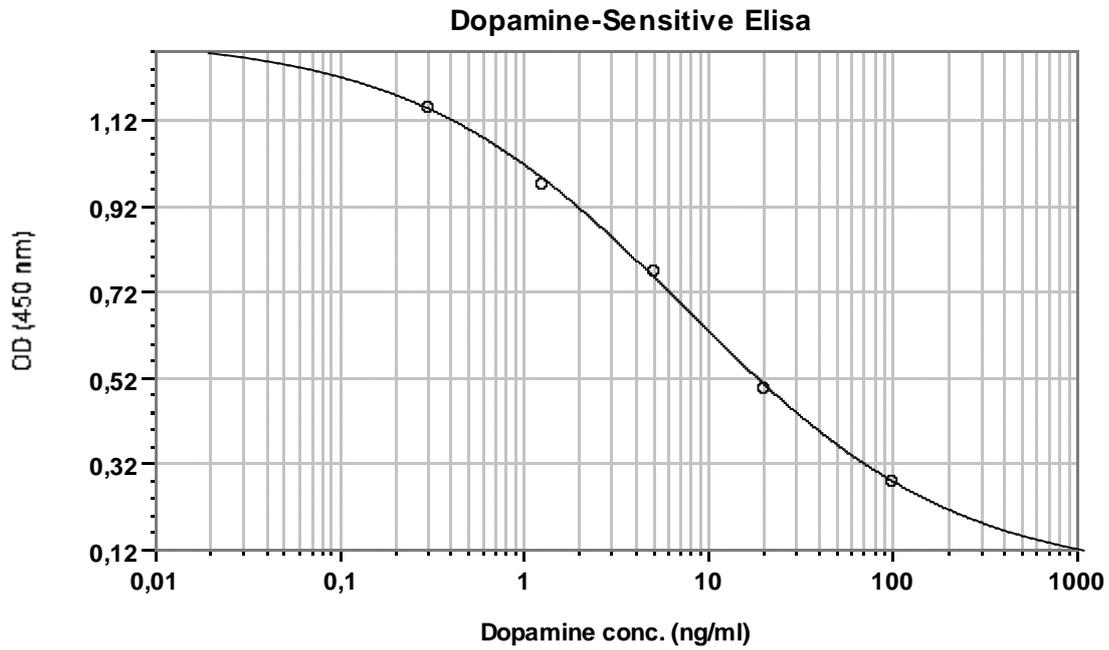
Volumenfaktor = 300 µl / 20 µl = 15

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    R<sup>2</sup>  
 ○ 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<br>(Volumenfaktor 15): | $\frac{89 \text{ pg/ml}}{15} = 5,9 \text{ pg/ml}$<br>(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<br>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 |
|-------------------------------|-----------|------------|--------|
| <b>Dopamin (grün):</b>        |           |            |        |
| 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