



Arbeitsanleitung

Serotonin High Sensitive ELISA

(Hochsensitiv und für kleine Probenvolumina)

Hochsensitiver Enzymimmunoassay
für die quantitative Bestimmung von Serotonin

REF EA 630/96

 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.	Einleitung und Testprinzip	Seite	4
2.	Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen	Seite	5
3.	Lagerung und Haltbarkeit	Seite	5
4.	Inhalt des Testbestecks	Seite	5
5.	Probengewinnung	Seite	7
6.	Vorbereitung der Proben und Reagenzien	Seite	8
7.	Testdurchführung ELISA	Seite	12
8.	Testauswertung	Seite	13
9.	Testcharakteristika	Seite	14
10.	Literatur	Seite	15
	Pipettierschema	Seite	16

Verwendete Symbole

 IVD	In-Vitro-Diagnostikum	 CE	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

Serotonin (5-Hydroxytryptamin) gehört in die Gruppe der biogenen Amine und ist ein Intermediärprodukt des Tryptophanstoffwechsels. Es ist ein gut dokumentierter Neurotransmitter des zentralen Nervensystems und ist in hohen Konzentrationen in den chromaffinen Zellen der Darmschleimhaut, in den Thrombozyten und den serotonergen Neuronen des Gehirns nachweisbar.

Zentral-serotonerge Neuronen beeinflussen physiologische Funktionen wie z. B. den Schlaf sowie die hormonelle und kardio-vaskuläre Regulation. Erhöhte Serumspiegel werden bei malignem Karzinoid, bei endogener Depression und Schizophrenie beobachtet. Serotonin ist ein spezifischer Tumormarker für das maligne Karzinoid.

Der Serotonin-Sensitive ELISA-Kit enthält Reagenzien für die quantitative Bestimmung von derivatisiertem Serotonin (5-Hydroxytryptamin) in niedrigkonzentrierten Proben bzw. für kleine Probenvolumina. Die Derivatisierung erfolgt während der Probenvorbereitung. Dabei wird Serotonin durch das Acylierungsreagenz quantitativ in N-Acylserotonin umgewandelt.

Der Serotonin-Sensitive ELISA ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay, in dem die Antigene um eine definierte Anzahl von Antikörper-Bindungsstellen konkurrieren. 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. Nach Anbruch ist der Kit bis zum 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
Mikrotiterstreifen mit je 8 Vertiefungen,
einzeln abbrechbar. | STRIPS | 12 Stück |
| 4.2 | Standard
4 ml, Konzentrat
Konzentration: 500 ng/ml
Einsatzkonzentrationen werden aus
diesem Standard verdünnt (s. auch 6.1.2.) | CAL | 1 Fläschchen |
| 4.3 | Kontrolle 1 & 2
Je 4 ml, Konzentrat
Vor dem Einsatz 1:500 verdünnen (s. auch 6.1.3.)
Bereich: Siehe Q.C.-Zertifikat im Kit | CON 1 & 2 | 2 Fläschchen |

- 4.4 **Acylierungspuffer** **ACYL-BUFF** 1 Fläschchen
lyophilisiert, mit 4 ml destilliertem Wasser lösen.
200 µl Acylierungspufferkonzentrat **ACYL-BUFF-CONC**
hinzugeben. Vorsichtig mischen, übermäßige
Schaumbildung vermeiden (s. auch 6.1.4.).
- 4.5 **Acylierungspufferkonzentrat** **ACYL-BUFF-CONC** 1 Fläschchen
1 ml, Konzentrat; gelb eingefärbt
 Achtung
- 4.6 **Acylierungsreagenz** **ACYL-REAG** 2 x 2 Fläschchen
lyophilisiert, Inhalt eines Fläschchens
mit 2,5 ml **SOLVENT** lösen (s. auch 6.1.5.).
- 4.7 **Deaktivator** **DEAC** 1 Fläschchen
3 ml, gebrauchsfertig; blau eingefärbt
- 4.8 **Enzymkonjugat** **CONJ** 1 Fläschchen
12 ml, gebrauchsfertig
Anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase
- 4.9 **Waschpuffer** **WASH** 1 Fläschchen
20 ml, Konzentrat
Inhalt mit destilliertem Wasser
auf 500 ml auffüllen (s. auch 6.1.6.).
- 4.10 **Substrat** **SUB** 1 Fläschchen
12 ml TMB-Lösung, gebrauchsfertig
- 4.11 **Stopplösung** **STOP** 1 Fläschchen
12 ml, gebrauchsfertig, Enthält 0,3 M Schwefelsäure
- 4.12 **Solvent** **SOLVENT** 2 Fläschchen
6 ml, gebrauchsfertig
Enthält Aceton
 Gefahr  Achtung
- 4.13 **Ascorbinsäure** **ASC-ACID 10%** 1 Fläschchen
2 ml, gebrauchsfertig
Enthält 10%ige Ascorbinsäure
- 4.14 **Standardpuffer** **STD-BUFF** 1 Fläschchen
50 ml
10 mM PBS (0,9 % NaCl), stabilisiert
Muss vor dem Einsatz auf 0,1 % Ascorbinsäure
angereichert werden (s. auch 6.1.1.).

4.15	Reaktionsplatte für die Acylierung, gebrauchsfertig	ACYL-PLATE	1 Stück
4.16	Haftklebefolie Gebrauchsfertig	FOIL	2 Stück

Weiter werden benötigt (nicht im Kit enthalten):

- Pipetten für 10, 20, 25, 50, 100 und 200 µl
- Mehrkanalpipette oder Waschgerät
- Photometer für die Auswertung von Mikrotiterplatten (450 nm)
- Horizontalschüttler
- Destilliertes Wasser

5. Probengewinnung

Der Test ist ausgelegt für kleine Probenvolumina bzw. sehr niedrige Konzentrationen in Gewebehomogenaten, Dialysaten und allgemein für verdünnte Proben.

Zur Vermeidung des oxidativen Zerfalls des Serotonins müssen die Proben 0,1 % Ascorbinsäure enthalten.

Die Proben können bis zu 6 Stunden bei 2 - 8 °C gelagert werden. Proben, die nicht sofort in dem Test eingesetzt werden, müssen bei -20 °C gelagert werden.

Wiederholtes Einfrieren und Wiederaufbauen sollte vermieden werden.

Als Verdünnungsmedium können unterschiedliche Puffer eingesetzt werden. Die Einstellung des Testes erfolgte mit Ringer-Puffer bzw. PBS (0,9% NaCl). Optional kann der Standardpuffer verwendet werden, aber auch die Einführung anderer Puffer ist nach vorheriger Überprüfung möglich. Alle als Verdünnungsmedium eingesetzten Puffer müssen auf 0,1 % Ascorbinsäure angereichert sein.

Für kleine Probenvolumina (< 20 µl) muss ein Ausgleich des Volumens mit Verdünnungsmedium (optional: Standardpuffer) stattfinden, so dass jeweils ein Probenvolumen von 20 µl erreicht wird.

Folgende Tabelle dient als Beispiel:

Probenvolumen	Verdünnungsmedium
1 µl	19 µl
2 µl	18 µl
5 µl	15 µl
10 µl	10 µl
15 µl	5 µl
20 µl	/

6. Vorbereitung der Proben und Reagenzien

6.1. Vorbereitung der Reagenzien

6.1.1. Standardpuffer

STD-BUFF

Der Standardpuffer ist vor dem Einsatz auf 0,1 % Ascorbinsäure anzureichern: 50 ml Standardpuffer + 0,5 ml **ASC-ACID 10%**.

Der gebrauchsfertige Standardpuffer muss für den späteren Gebrauch bei -20 °C eingefroren werden und bleibt so bis zum angegebenen Verfallsdatum verwendbar.

6.1.2. Standard

CAL

Der mitgelieferte Standard besitzt eine Serotoninkonzentration von 500 ng/ml (= 10.000 pg/sample).

Zur Erstellung einer Std-Kurve muss dieser auf folgende

Konzentrationen verdünnt werden: 0 / 0,67 / 2 / 6,7 / 20 / 100 pg/sample.

Std 6	100 pg/sample	990 µl Verdünnungsmedium	10 µl CAL
Std 5	20 pg/sample	800 µl Verdünnungsmedium	200 µl Std 6 (100 pg/sample)
Std 4	6,7 pg/sample	933 µl Verdünnungsmedium	67 µl Std 6 (100 pg/sample)
Std 3	2 pg/sample	980 µl Verdünnungsmedium	20 µl Std 6 (100 pg/sample)
Std 2	0,67 pg/sample	993 µl Verdünnungsmedium	6,7 µl Std 6 (100 pg/sample)
Std 1	0 pg/sample	1000 µl Verdünnungsmedium	

Als Verdünnungsmedium sollte der gleiche Puffer eingesetzt werden, mit dem auch die Proben gewonnen bzw. verdünnt wurden.

Optional: Zur Standard- und Probenverdünnung ist der Standardpuffer geeignet.

Alle als Verdünnungsmedium eingesetzten Puffer müssen zur Stabilisierung 0,1 % Ascorbinsäure enthalten (auch der Standardpuffer).

Die Verdünnung sollte in Polypropylen(PP)röhrchen, in Eppendorf Cups bzw. Reaktionsgefäßen aus PP erfolgen.

Die Standards sollten unmittelbar vor Gebrauch frisch angesetzt werden

6.1.3. Kontrolle 1 & 2

CON 1 & 2

Die mitgelieferten Kontrollen müssen vor dem Einsatz 1:500 verdünnt werden.

Kontrolle 1 (1:500):	5000 µl Verdünnungsmedium	10 µl Kontrolle 1
Kontrolle 2 (1:500):	5000 µl Verdünnungsmedium	10 µl Kontrolle 2

Als Verdünnungsmedium sollte der gleiche Puffer eingesetzt werden, mit dem auch die Proben gewonnen bzw. verdünnt wurden.

Optional kann der Standardpuffer verwendet werden.

Die Kontrollen sollten unmittelbar vor Gebrauch frisch angesetzt werden

6.1.4. Acylierungspuffer

ACYL-BUFF

Inhalt des Fläschchens in 4 ml destilliertem Wasser lösen.

200 µl Acylierungspufferkonzentrat **ACYL-BUFF-CONC** hinzugeben.

Kurz mischen und 30 min auf einen Rollmischer bzw. Horizontalschüttler legen. Vorsichtig mischen, übermäßige Schaumbildung vermeiden.

Der gelöste Acylierungspuffer muss für den späteren Gebrauch bei -20 °C eingefroren werden und bleibt so bis zum angegebenen Verfallsdatum verwendbar.

6.1.5. Acylierungsreagenz

ACYL-REAG

Inhalt des Fläschchens in je 2,5 ml **SOLVENT** lösen und für 5 min auf einen Rollmischer bzw. Horizontalschüttler legen. Das Acylierungsreagenz sollte unmittelbar vor Gebrauch frisch angesetzt werden und nach Gebrauch ist das Restreagenz zu verwerfen. Durch die vier Fläschchen im Kit ist der ELISA in vier Ansätzen teilbar. Wenn der Kit in einem Ansatz verbraucht werden soll, den aufgelösten Inhalt zweier Fläschchen vereinigen.

Bitte beachten: Solvent reagiert mit vielen Plastikmaterialien, z.B. Plastikschildchen. 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.

6.1.6. 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.

6.2. Probenvorbereitung (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 **25 µl Acylierungspuffer** in alle zu verwendenden Vertiefungen der Reaktionsplatte pipettieren.
2. Je **20 µl verdünnter Standard 1 - 6, Kontrolle 1 & 2 und Probe** in die jeweiligen Vertiefungen pipettieren.
Platte kurz schütteln.
3. Je **10 µl frisch zubereitetes Acylierungsreagenz** in alle Vertiefungen pipettieren (Rotfärbung) und **sofort** mit Punkt 4. fortfahren.
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.
4. Platte 60 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler inkubieren, dabei darf die Platte keinem direkten Sonnenlicht ausgesetzt sein.
Platte **nicht** abkleben oder abdecken, Platte offen schütteln.
5. Je **25 µl Deaktivator** in alle Vertiefungen pipettieren.
6. Platte **mit** Haftklebefolie abdecken und 3 Stunden bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler inkubieren, dabei darf die Platte keinem direkten Sonnenlicht ausgesetzt sein.

Je 50 µl der so vorbereiteten Proben werden in dem ELISA eingesetzt.

7. Testdurchführung ELISA

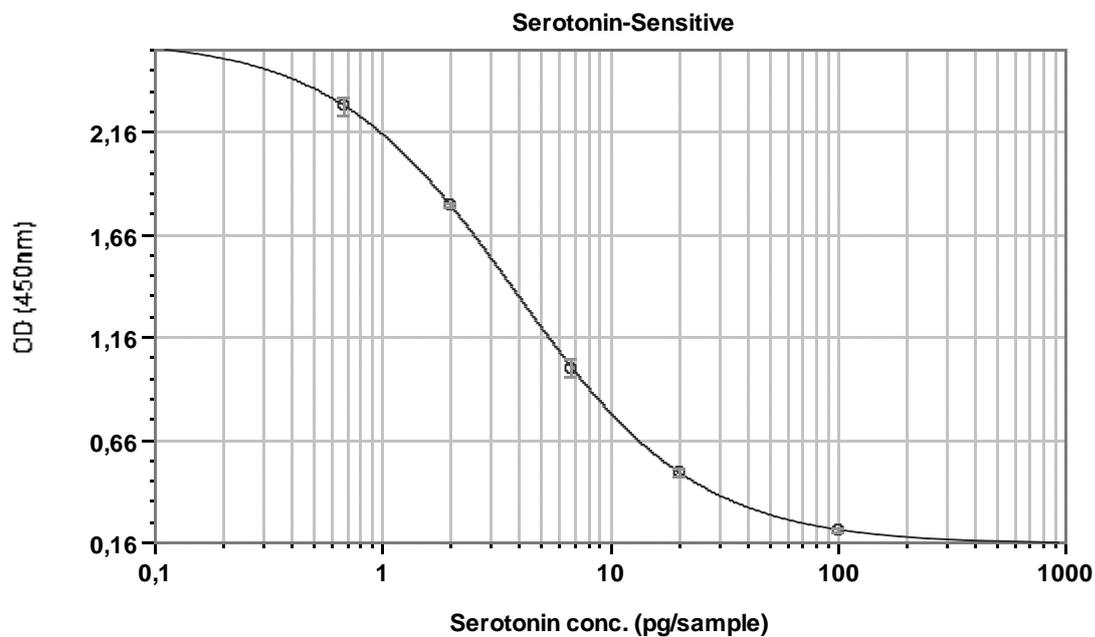
Die Reagenzien auf Raumtemperatur bringen und sorgfältig mischen, Schaumbildung vermeiden.

1. Je **50 µl vorbereitete Standards 1 bis 6, Kontrollen und Proben** in die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen pipettieren.
2. Platte mit Haftklebefolie abdecken und 15 - 20 Stunden (über Nacht) bei 2 - 8 °C inkubieren.
3. Vertiefungen entleeren, mit ca. **300 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 3 - 4 mal durchführen.
4. Jeweils **100 µl Enzymkonjugat** in alle Vertiefungen pipettieren.
5. 60 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler inkubieren.
6. Waschen: Wie unter Punkt 3. beschrieben.
7. Jeweils **100 µl Substrat** in alle Vertiefungen pipettieren.
8. 20 bis 30 Minuten bei Raumtemperatur (20 °C bis 25 °C) auf einem Horizontalschüttler inkubieren.
9. Jeweils **100 µl Stopplösung** in alle Vertiefungen pipettieren.
10. Streifen sofort (innerhalb 10 Minuten) im Mikrotiterplattenphotometer bei einer Messwellenlänge von 450 nm (Referenzwellenlänge zwischen 570 nm und 650 nm) messen.

8. Testauswertung

Die OD-Werte der Standards (linear) werden gegen die entsprechenden Konzentrationen der Standards (logarithmisch) aufgetragen. Die Konzentrationen der Kontrollen und der Proben können dann direkt aus der Eichkurve in pg/sample abgelesen werden.

Die folgende Abbildung zeigt ein typisches Beispiel einer Standardkurve.



$$y = ((A - D) / (1 + (x/C)^B)) + D$$

	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>D</u>	<u>R²</u>
Std (Standards: Concentration vs MeanValue)	2,612	1,089	3,791	0,154	1

9. Testcharakteristika

9.1. 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.

Sensitivität : 0,39 pg/sample

9.2. Spezifität (Kreuzreaktivitäten)

Der in dem Test verwendete Antikörper ist spezifisch für Serotonin. Getestet wurden die Kreuzreaktivitäten zu Tryptamin, 5-Methoxytryptamin, 5-Hydroxytryptophan, Melatonin, 5-HIAA, L-Tryptophan.

Substanz	50% Inhibition (pg/sample)	Kreuzreaktivität (%)
Serotonin	4,3	100
Tryptamin	1.996	0,22
5-Methoxytryptamin	17.083	0,025
5-Hydroxytryptophan	207.551	0,0021
Melatonin	677.434	< 0,001
5-HIAA	> 2.000.000	< 0,001
L-Tryptophan	> 20.000.000	< 0,0001

9.3. Reproduzierbarkeit

Die Reproduzierbarkeit des Serotonin-Sensitive-ELISAs wurde durch die Ermittlung des Intra-Assay-Variationskoeffizienten gezeigt:

Konzentrationsangaben in pg/sample

Intra-Assay

Probe	Anzahl n	Mittelwert	SD	VK (%)
1	40	4,7	0,41	8,7
2	40	11,9	0,79	6,6

10. Literatur

- Harenberg, J., Huhle, G., Giese, Ch., Wang, L., Feuring, M., Song, X., Hofmann, U.
Determination of serotonin release from platelets by enzyme immunoassay in the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia
British Journal of Hematology, **109**, 182-186 (2000)
- Balaskas, E., Bamihas, G., Karamouzis, M., Voyiatzis, G., Tourkantonis, A.
Histamine and Serotonin in uremic pruritus: effect of ondansetron in CAPD-pruritic patients
Nephron, **78:395-402** (1998)
- Stratz, T., Samborski, W., Hrycaj, P., Pap, T., Mackiewicz, S., Mennet, P., Müller, W.
Die Serotoninkonzentration im Serum bei Patienten mit generalisierter Tendomyopathie (Fibromyalgie) und chronischer Polyarthrit
Medizinische Klinik, **88**, 458-462 (1993)
- Attanasio, A. et al.
Diurnal rhythms of N-acetylserotonin and serotonin
J. Pineal res. **3** (1986), 251 - 256
- Kema, I.P. et al.
Influence of a Serotonin- and Dopamine-Rich Diet on Platelet Serotonin Content and Urinary Excretion of Biogenic Amines and Their Metabolites
Clin. Chem. **38/9** (1992), p.1730 – 1736
- Kema, I.P. et al.
Improved Diagnosis of Carcinoid Tumors by Measurement of Platelet Serotonin
Clin. Chem. **38/4** (1992), p. 534 - 540

Pipettierschema Probenvorbereitung

		Standards	Kontrollen	Proben
Acyl. Puffer	µl	25	25	25
verd. Standard 1- 6	µl	20		
verd. Kontrolle 1 & 2	µl		20	
Proben	µl			20

Platte kurz schütteln

frisch angesetzt Acylierungsreagenz	µl	10	10	10
--	----	----	----	----

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

Deaktivator	µl	25	25	25
-------------	----	----	----	----

Platte abkleben
3 Stunden bei Raumtemperatur schütteln

50 µl Überstand im ELISA einsetzen

Pipettierschema ELISA

		Standards	Kontrollen	Proben
Standard 1-6	µl	50		
Kontrolle 1 & 2	µl		50	
Proben	µl			50

Platte abkleben
15 – 20 Stunden (über Nacht) bei 2 - 8 °C inkubieren

3 - 4 x Waschen

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

60 Minuten bei Raumtemperatur schütteln

3 - 4 x Waschen

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

20 - 30 Minuten bei Raumtemperatur schütteln

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

Messung der Extinktion bei 450 nm