





Gebrauchsanweisung

1-Methylhistamin Plasma / Cell Culture - Kit

Ergänzungskit
für die quantitative Bestimmung von
1-Methylhistamin (N-Methylhistamin)
in Plasma und Zellkultur

Nur für Forschungszwecke

RUO

REF	MHP00
	96
	2 – 8 °C

 WESAMIN GmbH & Co.KG /
Gesellschaft für die Entwicklung und Produktion von diagnostischen Artikeln mbH
Graff 1 • 24568 Oersdorf • Tel 04191-722 68 65 • Fax 04191-722 68 67
E-Mail: kontakt@wesamin.de • Internet: www.wesamin.de

Version 1, März 2023

1. Einleitung und Testprinzip

Der 1-Methylhistamin Plasma / Cell Culture-Kit (Kat# MHP00) ist ein Ergänzungskit zum 1-Methylhistamin ELISA (Kat# MHE00). Nur die Kombination mit dem 1-Methylhistamin ELISA ermöglicht die quantitative Bestimmung von 1-Methylhistamin in EDTA- und Heparin-Plasmen und Zellkulturproben.

Bei Verwendung dieses Kits werden im ersten Schritt die Proteine aus den Proben durch Fällung entfernt.

Nachfolgend, unter Verwendung des 1-Methylhistamin Elisas (MHE00), wird 1-Methylhistamin durch das Acylierungsreagenz quantitativ in N-Acyl-1-Methylhistamin umgewandelt.

Der 1-Methylhistamin 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

- Nur für Forschungszwecke. Nur für den Gebrauch durch Fachpersonal.
- Vor der Testdurchführung sollte die Gebrauchsanweisung vollständig gelesen und deren Inhalt verstanden worden sein. Die gültige Version aus dem Kit verwenden.
- Einzelne Komponenten verschiedener Chargen und Testbestecke sollten nicht ausgetauscht werden. Die auf der Verpackung und den Etiketten der einzelnen Komponenten angegebenen Verfallsdaten und Lagerbedingungen sind zu beachten.
- Beim Handhaben der Reagenzien, Kontrollen und Patientenproben sind die gängigen Laborsicherheitsrichtlinien und die Gute Laborpraxis zu beachten.
- Während der Testdurchführung Kittel, Einmal-Handschuhe und Schutzbrille tragen.
- Ein Teil der Komponenten dieses Testbestecks enthalten Gefahrstoffe und sind kennzeichnungspflichtig. Diese Komponenten tragen das entsprechende Gefahrensymbol auf ihrem Etikett. Weitere Informationen befinden sich in *4. Inhalt des Kits* und auf den entsprechenden Sicherheitsdatenblättern.
- Vermeiden Sie alle Handlungen, die zu einem Verschlucken, Einatmen oder Injizieren der Reagenzien führen könnten. Niemals mit dem Mund pipettieren.
- Kontakt mit einzelnen Reagenzien vermeiden.

- Abfälle sollten nach den staatlichen und örtlichen Umweltschutzregularien entsorgt werden.
- Die Richtlinien zur Qualitätskontrolle im medizinischen Laboratorium bezüglich des Mitführens von Kontrollproben und/oder Poolproben, sollten beachtet werden.

3. Lagerung und Haltbarkeit



Der Kit wird bei Umgebungstemperatur geliefert und ist anschließend bei Lagerung zwischen 2 - 8 °C bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar.

Nach Anbruch ist der Kit bis zum Verfallsdatum haltbar.

Die Haltbarkeit der gebrauchsfertigen Reagenzien ist auf dem jeweiligen Flaschenetikett angegeben. Die Haltbarkeit und die Lagerung der vorbereiteten Reagenzien werden unter 6.1 geregelt.

Die Reagenzien müssen vor ihrer Verwendung auf Raumtemperatur gebracht und sofort nach Gebrauch wieder kühl gestellt werden.

4. Inhalt des Kits

4.1	Präzipitationsröhrchen für die Fällung	PRECI-TUBE		100 Stück
4.2	Präzipitator 1 3 ml, gebrauchsfertig	PRECI 1	 Achtung	1 Fläschchen
4.3	Präzipitator 2 3 ml, gebrauchsfertig, ätzend	PRECI 2	 Gefahr	1 Fläschchen
4.4	Folie gebrauchsfertig	FOIL		6 Stück

Zusätzliches Material (nicht im Kit enthalten):

- 1-Methylhistamin Elisa (Kat# MHE00)
- Pipetten für 20, 30, 40, 50, 80, 100 µl
- Mehrkanalpipette oder Waschgerät
- Multipette
- Destilliertes Wasser
- Mikrotiterplattenphotometer (450 nm)
- Horizontalschüttler
- Vortex-Mischer, Rollmischer
- Papiertücher, Pipettenspitzen, Stoppuhr
- Zentrifuge
- Polypropylen-Reaktionsgefäße zur Standardverdünnung

5. Probengewinnung

Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden.

Plasma

Für den Test kann EDTA-Plasma und Heparin-Plasma eingesetzt werden. Hämolytische, lipämische und ikterische Proben sollten nicht eingesetzt werden.

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

Zellkultur

Zellkulturmedium DMEM (+10% Fötale Kälberserum) und RPMI 1640 (+10% Fötale Kälberserum) wurde zur Validierung verwendet.

Weitere Zellkulturmedien sind vom Anwender zu testen.

6. Vorbereitung der Reagenzien und Proben

6.1 Vorbereitung der Reagenzien

Die Reagenzien auf Raumtemperatur bringen.

Das Ausgleichsreagenz **EQUA-REAG** wird nicht benötigt.

Waschpuffer

WASH

Inhalt (20 ml) des Waschpufferkonzentrates (50x) mit destilliertem Wasser auf ein Endvolumen von 1000 ml verdünnen, kurz mischen.

Der verdünnte Waschpuffer muss für den späteren Gebrauch bei 2 - 8 °C gelagert werden und bleibt so für 4 Wochen verwendbar.

Wird der Kit in mehreren Ansätzen verwendet, sollte nur die dafür benötigte Menge Waschpuffer angesetzt werden.

Acylierungs-Reagenz

ACYL-REAG

Benötigte Fläschchen Acylierungs-Reagenz dem Folienbeutel entnehmen, die übrigen Fläschchen im Folienbeutel zusammen mit dem Trockenmittel belassen und sorgfältig verschließen. Zur Rekonstitution des lyophilisierten Acylierungs-Reagenzes den Inhalt eines Fläschchens mit 3 ml Solvent lösen und mindestens 5 Minuten auf dem Rollmischer oder ähnlichem Schüttler mischen. Das Acylierungsreagenz sollte unmittelbar vor Testbeginn frisch angesetzt werden und ist dann mindestens 3 Stunden stabil. Im Kit sind 3 Flaschen Acylierungs-Reagenz enthalten, sodass der ELISA mehrmals teilbar ist. Wenn der Kit in einem Ansatz verbraucht wird, den aufgelösten Inhalt von zwei Fläschchen poolen. Nach Gebrauch ist das rekonstituierte Restreagenz zu verwerfen.

Alle anderen Reagenzien sind gebrauchsfertig.

6.2 Probenvorbereitung

Die für die Probenvorbereitung verwendeten Präzipitationsröhrchen (ein Röhrchen pro Standard, Kontrolle und Probe) und Vertiefungen der Preparation-Platte (für Doppelbestimmungen: Jeweils zwei Vertiefungen für Standard, Kontrolle und Probe) markieren (Edding) und nicht noch einmal verwenden!

Die mitgelieferten **Standards und Kontrollen** müssen unmittelbar vor jeder Verwendung **1:100 verdünnt** werden: Diese Verdünnungen sollten in Polypropylen(PP)-Reaktionsgefäßen (nicht mitgeliefert) erfolgen.

Messung von Plasmaproben:

Standards / Kontrollen: Verdünnung 1:100 mit dest. Wasser

Messung von Zellkulturproben:

Standards / Kontrollen: Verdünnung 1:100 idealerweise mit dem gleichen Zellkulturmedium in dem sich die Proben befinden.

Sollte dieses nicht möglich sein, können die Standards und Kontrollen auch 1:100 in dest. Wasser verdünnt werden. Dann müssen die Zellkulturproben vor dem Einsatz 1:5 in dest. Wasser verdünnt werden. Das Ergebnis ist mit dem Faktor 5 zu multiplizieren.

Beispiel 1:100 Verdünnung:

	Endkonzentration	Volumen Verdünnungsmedium	Vol. original Std
Std 1	0 ng/ml	990 µl	10 µl CAL 1 (0 ng/ml)
Std 2	0,1 ng/ml	990 µl	10 µl CAL 2 (10 ng/ml)
Std 3	0,3 ng/ml	990 µl	10 µl CAL 3 (30 ng/ml)
Std 4	1 ng/ml	990 µl	10 µl CAL 4 (100 ng/ml)
Std 5	3 ng/ml	990 µl	10 µl CAL 5 (300 ng/ml)
Std 6	10 ng/ml	990 µl	10 µl CAL 6 (1000 ng/ml)
Kontrolle 1	/	990 µl	10 µl CON 1
Kontrolle 2	/	990 µl	10 µl CON 2

Die Proben werden unverdünnt eingesetzt.

Es wird empfohlen, Doppelbestimmungen durchzuführen.

Sollten Einfachbestimmungen durchgeführt werden können die Volumina im Fällungsvorgang halbiert werden:

40µl verdünnte Standards, Kontrollen und unverdünnte Proben und jeweils 10µl Präzipitator 1 und 2. Nach der Zentrifugation werden 1 x 30µl Überstand entnommen.

Fällungsvorgang für Doppelbestimmung

(ein Präzipitationsröhrchen pro Standard, Kontrolle und Probe):

1. **80 µl der verdünnten Standards, Kontrollen und unverdünnten Proben** in entsprechend beschrifteten **Präzipitationsröhrchen** pipettieren.
2. **20 µl Präzipitator 1** in alle Röhrchen pipettieren.
3. **20 µl Präzipitator 2** in alle Röhrchen pipettieren.
4. Röhrchen kräftig mischen (Vortex).
5. Röhrchen 15 Minuten bei 4.000 x g zentrifugieren.

Acylierung

(jeweils zwei Wells pro Standard, Kontrolle und Probe):

6. **2 x 30 µl aus den Überstand** in die entsprechenden Vertiefungen der **Preparation-Platte (48 Well-Platten)** pipettieren.
7. **50 µl Acylierungspuffer** in alle Vertiefungen pipettieren
8. 10 Sekunden auf einem Horizontalschüttler schütteln.
9. **40 µl gelöstes Acylierungs-Reagenz** in alle Vertiefungen pipettieren. Platte sorgfältig mit Folie abkleben und sofort mit Punkt 10. fortfahren.
10. Platte 30 Minuten bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
11. **20 µl Antiserum** in alle Vertiefungen pipettieren. Platte sorgfältig mit Folie abkleben.
12. Platte 120 Minuten bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
100 µl werden im ELISA eingesetzt.

7. Testdurchführung ELISA

1. **100 µl Standards, Kontrollen und Proben** aus der Preparation-Platte in die entsprechenden Vertiefungen der Mikrotiterstreifen pipettieren.
Leichtes Schrägstellen der Preparation-Platte erleichtert die Volumenaufnahme.
Nicht benötigte Mikrotiterstreifen im Folienbeutel zusammen mit dem Trockenmittel belassen und sorgfältig verschließen.
2. Platte mit Haftklebefolie abdecken.
10 Sekunden auf einem Horizontalschüttler schütteln.
15 - 20 Stunden (über Nacht) bei 2 - 8 °C inkubieren.
3. Vertiefungen entleeren, mit ca. **300 µl verdünntem 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.
Alternativ kann auch ein Waschgerät verwendet werden.
4. **100 µl Enzymkonjugat** in alle Vertiefungen pipettieren.
5. Platte 30 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
6. Waschen: Wie unter Punkt 3. beschrieben.
7. **100 µl Substrat** in alle Vertiefungen pipettieren.
8. 10 Sekunden auf einem Horizontalschüttler schütteln.
25 ± 5 Minuten bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) auf dem Arbeitstisch mit einer Box abgedeckt ohne Schütteln inkubieren.
9. **100 µl Stopplösung** in alle Vertiefungen pipettieren
10 Sekunden auf einem Horizontalschüttler schütteln.
10. Platte im Photometer bei 450 nm (Referenzwellenlänge zwischen 570 nm und 650 nm) innerhalb von 15 Minuten messen.

8. Auswertung und Beurteilung

Standard	1	2	3	4	5	6
ng / ml	0	0,1	0,3	1	3	10
nmol / l	0	0,8	2,4	8	24	80

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

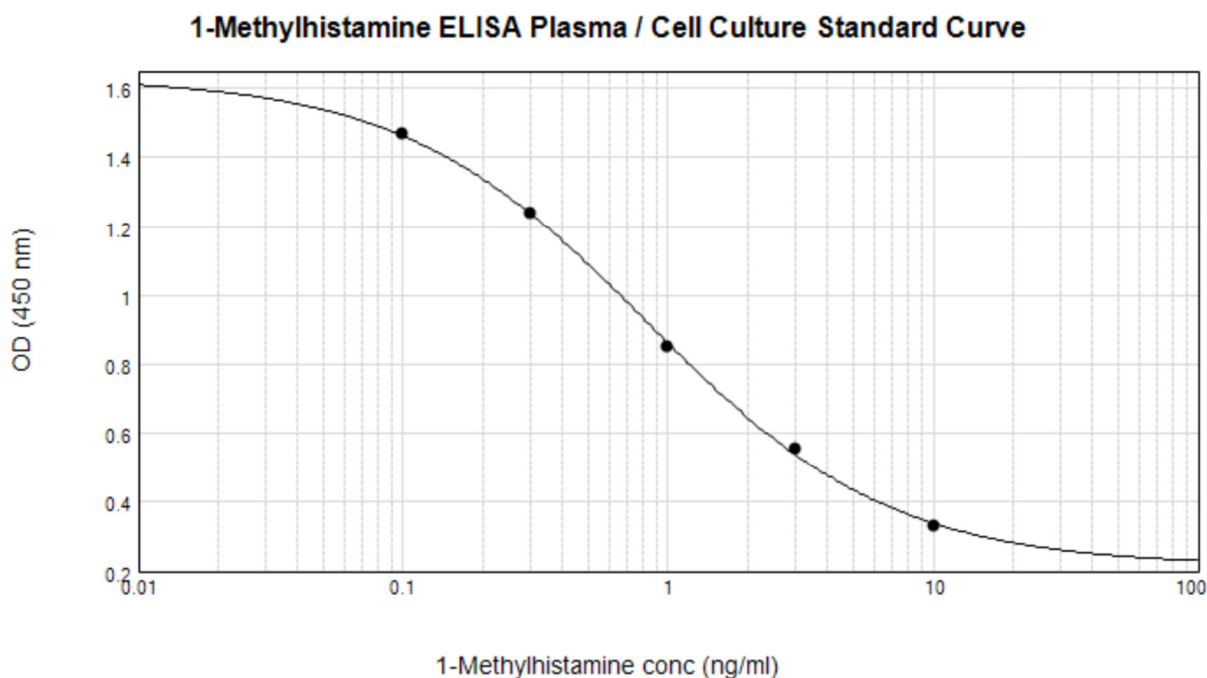
Die ODs (optische Dichten) der Standards (linear) werden gegen die entsprechenden Konzentrationen der Standards (logarithmisch) aufgetragen.

Bei Verwendung eines Computerprogramms wird die 4-Parameter-Analyse empfohlen (Alternativ: Cubic-Spline oder Logit-Log).

Die Konzentrationen der Proben können direkt aus der Standardkurve in ng / ml abgelesen werden.

Die Konzentrationen der Kontrollen müssen mit dem Faktor 100 multipliziert werden.

Die Abbildung zeigt ein typisches Beispiel:



9. Testcharakteristika

9.1 Sensitivität

Matrix	Untere Nachweisgrenze	Berechnung
Plasma; Zellkultur	0,029 ng/ml	OD _{Cal1} - 2xSD

9.2 Wiederfindung nach Spiken

Matrix	Bereich (ng/ml)	Mittelwert (%)	Bereich (%)
EDTA-Plasma	0,32 – 2,81	93	91 - 94
Heparin-Plasma	0,26 – 4,36	103	94 - 107
Zellkultur (DMEM + 10% FKS)	0,32 – 2,79	94	90 - 101
Zellkultur (RPMI + 10% FKS)	0,31 – 2,60	92	91 - 95

9.3 Linearität

Wiederfindung nach Verdünnung mit dest. Wasser

Matrix	Bereich (ng/ml)	Höchste Verd.	Mittelwert (%)	Bereich (%)
EDTA-Plasma	0,70 – 9,79	1 : 15	94	87 - 106
Heparin-Plasma	0,38 – 5,55	1 : 15	102	90 - 111

Wiederfindung nach Verdünnung mit Zellkulturmedium

Matrix	Bereich (ng/ml)	Höchste Verd.	Mittelwert (%)	Bereich (%)
Zellkultur (DMEM + 10% FKS)	0,81 – 3,74	1 : 5	104	95 - 108
Zellkultur (RPMI + 10% FKS)	0,82 – 4,19	1 : 5	94	90 - 98

9.4 Reproduzierbarkeit

Intra-Vk

Matrix	Bereich (ng/ml)	Intra-Assay-Vk (%)
EDTA-Plasma	0,33 – 0,92	6,7 – 8,2
Zellkultur	0,37 – 1,29	9,9 – 8,1

Inter-Vk

Matrix	Bereich (ng/ml)	Intra-Assay-Vk (%)
EDTA-Plasma	0,31 – 0,81	9,9 – 8,9

Pipettierschema Vorbereitung

Präzipitationsröhrchen		Standard	Kontrolle	Probe
Verd. Standard 1 – 6	µl	80		
Verd. Kontrolle 1 & 2	µl		80	
Probe	µl			80
Präzipitator 1	µl	20	20	20
Präzipitator 2	µl	20	20	20

Kräftig vortexen

15 Minuten bei 4.000 x g zentrifugieren

Preparation-Platte (48 Well)		Standard	Kontrolle	Probe
Standard 1 - 6	µl	30		
Kontrolle 1 & 2	µl		30	
Probe	µl			30
Acylierungspuffer	µl	50	50	50

Platte 10 Sekunden schütteln

Acylierungsreagenz	µl	40	40	40
---------------------------	----	----	----	----

Platte sorgfältig mit Folie abkleben

Sofort 30 Minuten bei Raumtemperatur schütteln

Antiserum	µl	20	20	20
------------------	----	----	----	----

Platte sorgfältig mit Folie abkleben

120 Minuten bei Raumtemperatur schütteln

100 µl im ELISA einsetzen

Pipettierschema ELISA

		Standard	Kontrolle	Probe
Acyl. Standard	µl	100		
Acyl. Kontrolle	µl		100	
Acyl. Probe	µl			100

Platte sorgfältig mit Folie abkleben
 Platte 10 Sekunden schütteln
 15 – 20 Stunden (über Nacht) bei 2 - 8 °C inkubieren

4 x Waschen

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

30 Minuten bei Raumtemperatur schütteln

4 x Waschen

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

Platte 10 Sekunden schütteln
 25 ± 5 Minuten bei Raumtemperatur abgedeckt (Box), ohne schütteln

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

Platte 10 Sekunden schütteln

Messung der Extinktion bei 450 nm