



Gebrauchsanweisung

Dopamin - ELISA

Enzymimmunoassay
für die quantitative Bestimmung von
Dopamin
in Plasma und Urin



REF D00

Σ 96

$+2$ $+8$
°C 2 – 8 °C

Inhaltsverzeichnis

1. Einführung und Testprinzip	Seite 3
2. Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen	Seite 4
3. Lagerung und Haltbarkeit	Seite 4
4. Inhalt des Testbestecks	Seite 5
5. Probengewinnung und -lagerung	Seite 7
6. Vorbereitung der Reagenzien und Proben	Seite 8
7. Testdurchführung ELISA	Seite 11
8. Auswertung	Seite 12
9. Testcharakteristika	Seite 13
Pipettierschema Probenvorbereitung	Seite 15
Pipettierschema ELISA	Seite 16



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 Waschschriff 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

- Nur zur in vitro Diagnostik. Nur für den Gebrauch durch Fachpersonal.
- 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.
- Einzelne Komponenten verschiedener Chargen und Testbestecke sollten nicht ausgetauscht werden. Die auf der Verpackung und den Etiketten der einzelnen Komponenten angegebenen Verfallsdaten 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 Testbestecks* und auf den entsprechenden Sicherheitsdatenblättern.
- Kontakt mit einzelnen Reagenzien vermeiden, diese können Reizungen und Verätzungen verursachen.
- 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 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** **EX-PLATE** 2 Stück
48 Vertiefungen
beschichtet mit Boronat-Affinitätsgel
- 4.2. **Extraktions-Puffer** **EX-BUFF** 1 Fläschchen
6 ml, gebrauchsfertig
- 4.3 **Salzsäure** **HCL** 1 Fläschchen
21 ml, gebrauchsfertig
0,025 M HCl
- 4.4 **Standards (1 - 7)** **CAL 1 - 7** 7 Fläschchen
Je 4 ml, gebrauchsfertig,
Konzentrationen:

Standard:		1	2	3	4	5	6	7
Dopamin	ng / ml	0	1,5	10	40	160	640	2.560
	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. Plastikschälchen.
Sie reagieren nicht mit normalen Pipettenspitzen und Glasgefäßen.
- 4.7 **Acylierungs-Puffer** **ACYL-BUFF** 1 Fläschchen
20 ml, gebrauchsfertig
- 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
2 ml, gebrauchsfertig



Achtung

Reagenzien für den ELISA:

- 4.11 **Dopamin-Antiserum** **AS-DA** 1 Fläschchen
6 ml, gebrauchsfertig, vom Kaninchen
grün gefärbt
- 4.12 **MT-Streifen**
Mikrotiterstreifen mit je 8 Kavitäten, einzeln abbrechbar
vorbeschichtet mit:
Dopamin, farblos **STRIPS-DA** 12 Stück
- 4.13 **POD-Konjugat** **CONJ** 1 Fläschchen
12 ml, gebrauchsfertig
Anti-Kaninchen IgG-POD Konjugat
- 4.14 **Waschpuffer** **WASH** 2 Fläschchen
20 ml, Konzentrat
Inhalt mit dest. Wasser auf 1000 ml auffüllen
- 4.15 **Substrat** **SUB** 1 Fläschchen
12 ml TMB-Lösung, gebrauchsfertig
- 4.16 **Stopplösung** **STOP** 1 Fläschchen
12 ml, gebrauchsfertig
Enthält 0,3M Schwefelsäure
- 4.17 **Haftklebefolie** **FOIL** 10 Stück
Gebrauchsfertig

Weiter werden benötigt (nicht im Kit enthalten)

- Pipetten für 20, 50, 300, 1000 µl
- Multipipetten für 20, 50, 100, 150, 200, 250, 1000µl
- Schüttler (horizontal)
- Mehrkanalpipette oder 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 1000 ml auffüllen. Der verdünnte Waschpuffer muss für den späteren Gebrauch bei 2 - 8 °C gelagert werden und bleibt so für 4 Wochen verwendbar. Für eine Lagerung bis zum Verfallsdatum muss der verdünnte Waschpuffer bei -20 °C eingefroren werden.

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 2 ml destilliertem Wasser auflösen. Anschließend 0,3 ml **COENZYME** und 0,3 ml **ENZYME-BUFF** dazupipettieren (Endvolumen 2,6 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 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 destilliertes 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. 60 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer 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 Pipettenspitzen 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 **200 µl Salzsäure** zur Elution der Catecholamine 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!

Vom Überstand werden je 50 µl im Dopamin-ELISA eingesetzt.

7. Testdurchführung ELISA

1. Je **20 µl** der frisch vorbereiteten **Enzymlösung** in alle Vertiefungen der Mikrotiterstreifen (farblos) pipettieren.
2. Je **50 µl vorbereitete Standards, Kontrollen und Patientenproben** in die entsprechenden Vertiefungen pipettieren. Die entstehenden Rotfärbungen zeigen die bereits pipettierten Vertiefungen an.
3. Platte mit Haftklebefolie abdecken und 30 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
4. Je **50 µl Dopamin-Antiserum (grün)** in alle Vertiefungen pipettieren.
5. Platte mit Haftklebefolie abdecken. Kurz auf dem Horizontalschüttler mischen und 12 - 20 Stunden (über Nacht) bei 2 - 6 °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 Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
9. Waschen: Wie unter Punkt 6. beschrieben.
10. Je **100 µl Substrat** in alle Vertiefungen pipettieren.
11. 10 Sekunden auf einem Horizontalschüttler schütteln. 30 ± 5 Minuten bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) auf dem Arbeitstisch mit einer Box abgedeckt, ohne schütteln, inkubieren.
12. Je **100 µl Stopplösung** in alle Vertiefungen pipettieren. 10 Sekunden auf einem Horizontalschüttler schütteln.
13. 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 Konzentrationen der Patientenproben können dann direkt aus der Standardkurve in ng/ml abgelesen werden.

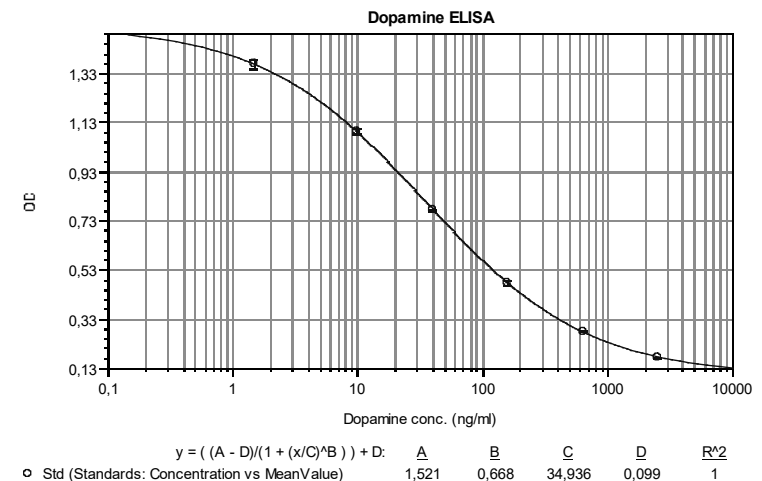
Die abgelesenen Konzentrationen der Urinproben und der Kontrollen können ohne weitere Umrechnung übernommen werden.

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.

Umrechnung:

Dopamin: 1 ng / ml = 6,53 nmol / l

Typisches Beispiel:



9. Testcharakteristika

Referenzbereiche

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

Matrix	Referenzbereich
Urin	< 600 µg/Tag
EDTA-Plasma	< 100 pg/ml

Sensitivität

Matrix	Untere Nachweisgrenze	Berechnung
Urin	0,43 ng/ml	OD _{Cal1} - 2xSD
EDTA-Plasma	29 pg/ml	OD _{Cal1} - 2xSD

Spezifität (Kreuzreaktivitäten)

Substanz	Kreuzreaktivität (%)
Dopamin	100
Adrenalin	< 0,02
Noradrenalin	0,45
Metanephrin	< 0,01
Normetanephrin	< 0,01
3-Methoxytyramin	< 0,01
L-Dopa	< 0,01
Tyramin	< 0,01
Tyrosin	< 0,002
Homovanillinsäure	< 0,001
Vanillinmandelsäure	< 0,001

Wiederfindung nach Spiken

Matrix	Bereich (ng/ml)	Mittelwert (%)	Bereich (%)
Urin	136 – 479	92	90 - 96
EDTA-Plasma	0,01 – 17,1	101	91 – 110

Linearität

Matrix	Bereich (ng/ml)	Höchste Verd.	Mittelwert (%)	Bereich (%)
Urin	48 – 750	1 : 15 mit dest. Wasser	98	95 - 101
EDTA-Plasma	0,45 – 5,86	1 : 15 mit dest. Wasser	107	97 - 115

Reproduzierbarkeit

Matrix	Bereich (ng/ml)	Intra-Assay-Vk	Bereich (ng/ml)	Inter-Assay-Vk
Urin	111 – 426	9,3 – 10,1 %	108 – 400	10,1 – 10,7 %
EDTA-Plasma	0,66 – 5,10	13,0 – 8,2 %		

Methodenvergleich

Matrix	Vergleichsmethode	Korrelation
Urin	HPLC	Y = 0,90 x HPLC + 24; R = 0,982; N = 32

9.4 Kalibrierung

Die Kalibrierung erfolgt durch Einwaage der Reinsubstanz. Die Richtigkeit der Methode wurde durch den Vergleich mit den Referenzbereichen und den Methodenvergleichen festgestellt.

9.5 Grenzen der Methode

Das Ergebnis des AND-CAT Elisass ist im Zusammenhang mit weiteren diagnostischen Verfahren und der Anamnese und der daraus resultierenden Fragestellung zu sehen.

Proben, die oberhalb des höchsten Standards gemessen wurden, müssen mit dem entsprechenden Medium (s. Linearität) verdünnt und erneut bestimmt werden.

9.6 Interferenzen

Hämolytische, lipämische und ikterische Proben sollten nicht eingesetzt werden.

Nicht angesäuerte Sammelurine nicht verwenden.

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 mischen

Platte ausleeren und Flüssigkeitsreste ausklopfen

Waschpuffer μl	1.000	1.000	1.000	1.000
---------------------------	-------	-------	-------	-------

5 Minuten bei RT vorsichtig mischen

Platte ausleeren und Flüssigkeitsreste ausklopfen

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

Sofort 20 Minuten bei RT mischen

Platte ausleeren und Flüssigkeitsreste ausklopfen

Waschpuffer μl	1.000	1.000	1.000	1.000
---------------------------	-------	-------	-------	-------

5 Minuten bei RT vorsichtig mischen

Platte ausleeren und Flüssigkeitsreste ausklopfen

Waschpuffer μl	1.000	1.000	1.000	1.000
---------------------------	-------	-------	-------	-------

5 Minuten bei RT vorsichtig mischen

Platte ausleeren und Flüssigkeitsreste ausklopfen

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

Mit Folie abkleben; 20 Minuten bei RT mischen

Platte anschließend nicht ausleeren

Je **50 μl** im ELISA einsetzen

Pipettierschema - ELISA

	Standards	Kontrollen	Proben
Dopamin (farblos):			
Enzymmix (frisch) μl	20	20	20
Standard 1 - 7 μl	50		
Kontrollen 1&2 μl		50	
Proben μl			50
Mit Folie abkleben; 30 Minuten bei RT mischen			
Dopamin Antiserum (grün) μl	50	50	50

Platte mit Folie abkleben
Kurz auf dem Horizontalschüttler mischen und für
12 – 20 Stunden (über Nacht) bei 2 - 6 °C inkubieren

4 x waschen

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

30 Minuten bei Raumtemperatur schütteln

4 x waschen

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

Platte 10 Sekunden schütteln
30 \pm 5 Minuten bei Raumtemperatur abgedeckt (Box), ohne schütteln

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

Platte 10 Sekunden schütteln

Messung der Extinktion bei 450 nm