



Schwein und andere Tierarten

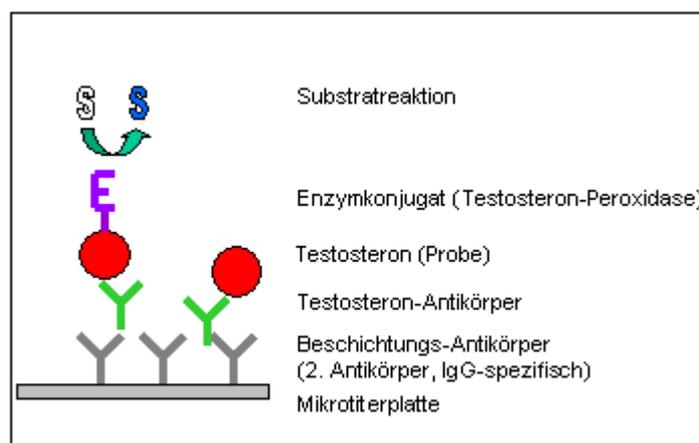
Testosteron ELISA, EIA

Enzymimmunoassay für Testosteron in porcinem Serum/Plasma

Kurzbeschreibung der Assay-Durchführung

1. Testbestandteile und Lösungen auf Raumtemperatur bringen (Ausnahme: Tracer-Stammlösung und Antikörper-Stammlösung)
2. Testpufferkonzentrat verdünnen
3. Proben mit Testpuffer verdünnen (z.B. 1:50)
4. Eine ausreichende Zahl an beschichteten Streifen in den Rahmen platzieren und beschriften
5. Herstellung des benötigten Volumens an Tracerlösung (1:180 in Testpuffer mit 10% porcine Serummatrix) und Antiserumlösung (1:500 in Testpuffer)
6. 50 µl Tracerlösung in alle Vertiefungen pipettieren
7. 50 µl Standards, Kontrollen oder (vorverdünnte) Proben hinzufügen
8. 50 µl Antiserumlösung hinzufügen
9. Testplatte ca. 5 Minuten schütteln und dann über Nacht (16-24h) bei 2-8°C inkubieren
- 10.
11. Waschpuffer-Konzentrat verdünnen
12. Platte 4 mal mit Waschpuffer waschen
13. 100 µl Substrat pipettieren
14. 45 ± 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
15. 100 µl Stopplösung hinzufügen und die Extinktion bei 450 nm bestimmen (595-650 nm als Referenz-Wellenlänge)

Prinzip der Methode





Der Testosteron-Enzymimmunoassay ist ein kompetitiver ELISA in 96-well Mikrotiterplatten (12 x 8-well Streifenplatte).

Im ersten Inkubationsschritt konkurriert freies Testosteron (Probe, Kontrolle oder Standard) mit dem Tracer (Testosteron gekoppelt an Meerrettich-Peroxidase) um eine begrenzte Zahl an Antigen-Bindungsstellen der Testosteron-spezifischen Anti-körper. Gleichzeitig werden diese Antikörper durch einen zweiten an die Plattenoberfläche gebundenen Antikörper fixiert.

Nach Entfernung des Überschusses der Testkomponenten durch Waschen wird die Enzymaktivität des Tracers mittels Tetramethyl-benzidine (TMB) als Substrat bestimmt.

Testbestandteile

1. **Mikrotiterplatte**(12 x 8-well Streifenplatte)
2. **Testosteron Standards**
 - A 0 ng/ml
 - B 10,0 ng/ml
 - C 5,0 ng/ml
 - D 2,5 ng/ml
 - E 1,25 ng/ml
 - F 0,63 ng/ml
 - G 0,31 ng/ml
3. **Niedrig-Kontrolle:** 1 ng/ml (0,8 to 1,2 ng/ml)
Hoch-Kontrolle: 4 ng/ml (3,2 to 4,8 ng/ml)
4. **50x Waschpuffer-Konzentrat**
Enthält 0,01% Thimerosal als Präservativ
5. **2x Testpuffer-Konzentrat**
BSA in einer gepufferten Kochsalzlösung mit Farbstoff und 0,01% Thimerosal als Präservativ
6. **Tracer-Stammlösung**
Enthält 50% Glycerin als Gefrierschutz. **Bei -18°C bis -25°C lagern**
7. **Porcine Serummatrix**
Für Tracerlösung
8. **Antiserum-Stammlösung**
Enthält 50% Glycerin als Gefrierschutz. **Bei -18°C bis -25°C lagern**
9. **Substratlösung**
One-step TMB-Substrat
10. **Stop Solution**
1 M HCl

Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen

- Verwendung des Tests nur zu Forschungszwecken, nicht für die Diagnose.
- Proben müssen als potentiell infektiöses Material betrachtet werden. Ein Befolgen der allgemein gültigen Vorsichtsmaßnahmen bei Verwendung dieses Tests und der Proben ist essentiell.
- Behälter und ungenutzte Inhaltsstoffe sind gemäß den Anforderungen bundesweit, landesweit und örtlich geltender Bestimmungen zu entsorgen.
- Lagerung der Testreagenzien wie angegeben.
- Bestimmung der Proben im Doppelansatz.
- Die Benutzung von Mehrkanalpipetten oder Multipipetten wird dringend empfohlen um Zeitverzögerungen bei der Reagenzzugabe zu minimieren.
- Genaues Pipettieren und die Verwendung von kalibrierten Geräten ist essentiell.
- Alle anerkannten Waschmethoden sind erlaubt; der Gebrauch eines automatischen Platten-Waschgerätes ist manuellen Methoden vorzuziehen.
- In jedem Assay muss eine Standardkurve mitgeführt werden.
- Ausreichendes Mischen der Standards, Kontrollen, Proben und der Gebrauch eines Mikrotiterplatten-Schüttlers sind notwendig für eine akzeptable Testqualität.



Vorbereitung der Reagenzien

Die Reagenzien und Mikrotiterplatten müssen vor Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht werden - mit Ausnahme der Tracer-Stammlösung und der Antiserum-Stammlösung!
Mögliche Präzipitate in den Pufferkonzentraten müssen vor Verdünnung vollständig gelöst werden.

Beschichtete Teststreifen

Entnehmen des Plattenrahmens und der notwendigen Anzahl von Teststreifen aus dem Beutel. Danach ist sicherzustellen, dass Beutel mit nicht gebrauchten Streifen vollständig verschlossen (verklebt) werden und das Trockenmittel enthalten ist.

Waschpuffer

Vorbereitung der benötigten Menge von Waschpuffer durch Verdünnung von 50x Waschpuffer-Konzentrat 1:50 mit entionisiertem Wasser.

Beispiel: 10 ml 50x Waschpuffer-Konzentrat werden mit 490 ml entionisiertem Wasser versetzt.
Eine Lagerung des Waschpuffers bei 2-8°C ist für 2 Wochen nach der Herstellung möglich.

Testpuffer

Vorbereitung der benötigten Menge von Testpuffer durch Verdünnung von 2x Testpuffer-Konzentrat 1:2 mit entionisiertem Wasser.

Beispiel: 25 ml 2x Testpuffer-Konzentrat werden mit 25 ml entionisiertem Wasser versetzt.
Eine Lagerung des Testpuffers bei 2-8°C ist für 2 Monate nach der Herstellung möglich.

Tracerlösung

Erwärmung der Glycerin-haltigen Stammlösungen vermeiden!

Tracerlösung erst unmittelbar vor dem Gebrauch vorbereiten. Die Gebrauchslösung nicht lagern.

Glycerin-haltige Stammlösungen sind etwas zähflüssig. Zum Pipettieren empfiehlt es sich etwa 3 mm von der Pipettenspitze abzuschneiden, das gewünschte Volumen langsam aufzuziehen und dann in Testpuffer abzugeben. Die Spitze muss durch wiederholtes (5-10 mal) Ansaugen/Abgeben ausgespült werden.

Testosteron Tracer-Stammlösung 1:180 in Testpuffer verdünnen und 10% porcine Serummatrix hinzufügen.

Beispiele:

4 Streifen: 1,8 ml Testpuffer + 11,1 µl Tracer Stammlösung + 200 µl Serummatrix

12 Streifen: 5 ml Testpuffer + 30,5 µl Tracer Stammlösung + 500 µl Serummatrix.

Antiserumlösung

Erwärmung der Glycerin-haltigen Stammlösungen vermeiden!

Tracerlösung unmittelbar vor dem Gebrauch vorbereiten. Die Gebrauchslösung nicht lagern.

Glycerin-haltige Stammlösungen sind etwas zähflüssig. Zum Pipettieren empfiehlt es sich etwa 3 mm von der Pipettenspitze abzuschneiden, und das gewünschte Volumen langsam aufzuziehen und dann in Testpuffer abzugeben. Die Spitze muss dann durch wiederholtes (5-10 mal) Ansaugen/Abgeben ausgespült werden.

Testosteron Tracer-Stammlösung 1:600 in Testpuffer verdünnen.

Beispiele:

4 Streifen: 2,0 ml Testpuffer + 4 µl Antiserum Stammlösung

12 Streifen: 5,5 ml Testpuffer + 11 µl Antiserum Stammlösung.

Lagerung

- Tracer Stammlösung und Antiserum Stammlösung müssen bei -18°C bis -25°C gelagert werden.
- Lagerung aller anderen Kit-Bestandteile bei 2-8°C.



Testdurchführung

Die gesamte Anleitung muss vor der Testdurchführung gelesen werden.

Peroxidase und das TMB-Substrat sind lichtempfindlich. **Direktes Sonnenlicht ist zu vermeiden.**

Mikrotiterplatte/Teststreifenrahmen sollten während der Inkubationen in Aluminiumfolie eingeschlagen werden.

Beachten Sie bitte auch die [Empfehlungen zur Testdurchführung](#).

Probeninkubation

1. Beschichtete Streifen-/Mikrotiterplatte vor Öffnen des Beutels auf Raumtemperatur bringen. Den Rahmen und die benötigte Anzahl an Streifen entnehmen. Beutel mit ungebrauchten Streifen müssen das Trocknungsmittel enthalten und sorgfältig verschlossen werden.
2. Die benötigte Anzahl an Streifen im Rahmen platzieren und beschriften um ein Verwechseln bei versehentlichem Herauslösen der Streifen zu vermeiden. Abdecken der Platte/Streifen während allen Inkubationsschritten.
3. Vorverdünnung der Proben nach Bedarf mit Testpuffer (z.B. 1:50).
4. 50 µl Tracerlösung in jede Vertiefung mittels Mehrkanalpipette geben.
5. 50 µl Standards, Kontrollen und vorverdünnte Proben hinzufügen.
6. 50 µl Antiserumlösung in jede Vertiefung mittels Mehrkanalpipette hinzufügen.
7. Inhalt der Platte auf einem Mikrotiter-Plattenschüttler für 5-10 min mischen.
8. Inkubation über Nacht (16-24h) bei 4°C.

Substratinkubation

9. Platte 4-mal waschen:

Streifen/Platte ausleeren. Mindestens 250 µl Waschpuffer in jede Vertiefung füllen.

Diesen Vorgang 3 x wiederholen.

Ein automatisches Mikrotiter-Waschgerät ist einem manuellen Waschen vorzuziehen.

Nach dem letzten Waschschrift die Streifen/Platte auf einer saugenden Unterlage (z.B. Papierhandtuch) trocken klopfen.

10. Sofort 100 µl Substratlösung in jede Vertiefung pipettieren.

11. Inkubation für 45 ± 10 min bei Raumtemperatur.

Stoppen/Messen

12. 100 µl der Stopplösung in jede Vertiefung hinzufügen. Die Stopplösung im gleichen Muster und Zeitintervall wie die Substratlösung hinzufügen.

13. Extinktion bei 450 nm bestimmen (wenn möglich, eine Wellenlänge zwischen 595-650 nm als Referenz benutzen). Wichtig ist, dass sich keine großen Blasen in den Vertiefungen befinden (revers pipettieren!) und dass der Boden der Streifen/Platte sauber ist. Die Messung sollte sofort (innerhalb 5 min) nach dem Abstoppen erfolgen.

14. Der Gebrauch einer entsprechenden Computersoftware für die Erstellung der Standardkurve und zur Probenbestimmung ist essentiell (z.B. 4-Parameter Methode).

15. Bestimmung der Probenkonzentration anhand der Standardkurve. Wenn sich die Probenvorverdünnung von 1:50 unterscheidet müssen die Proben entsprechend multipliziert werden.

16. Kontrollwerte sollten innerhalb des angegebenen Bereichs liegen.

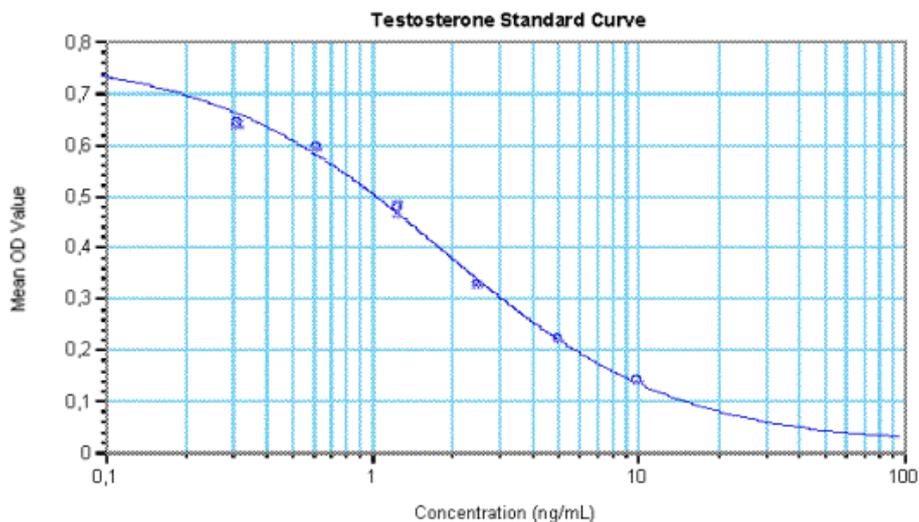
Die Kontrollwerte sollen die Validität der Standardkurve und der Probenergebnisse sicherstellen. Jedes Labor sollte eigene Parameter für akzeptable Testgrenzen ermitteln. Wenn die Kontrollwerte nicht in diesen Grenzen liegen, sollte das Ergebnis als fraglich deklariert und die Bestimmung der Proben wiederholt werden.

Die angegebenen Konzentrationen der Standardkurve beziehen sich auf Serum-/Plasma-Proben bei einer Vorverdünnung von 1:50 in Testpuffer.



Beispieldaten und Standardkurve

Sample	Concentration	Wells	Values	MeanValue	Std.Dev.	CV%
Std1	0,000	A1	0,814	0,775	0,029	3,7
		A2	0,777			
		H1	0,767			
		H2	0,744			
Std2	10,000	B1	0,137	0,138	0,001	0,9
		B2	0,139			
Std3	5,000	C1	0,217	0,219	0,003	1,2
		C2	0,221			
Std4	2,500	D1	0,329	0,326	0,003	1,0
		D2	0,324			
Std5	1,250	E1	0,485	0,475	0,015	3,1
		E2	0,464			
Std6	0,625	F1	0,596	0,594	0,003	0,5
		F2	0,592			
Std7	0,313	G1	0,645	0,641	0,006	1,0
		G2	0,637			



$$y = \frac{(A - D)}{1 + (x/C)^B} + D$$

	A	B	C	D	R ²
○ STD#1 (Standards: Concentration vs MeanValue)	0,771	0,99	1,858	0,014	0,997

Sample	Wells	OD Values	Concentration	Mean Conc.	Std.Dev.	CV%
Low Ctrl	A3	0,512	0,958	1,016	0,082	8,1
	B3	0,493	1,074			
High Ctrl	C3	0,246	4,241	4,208	0,047	1,1
	D3	0,249	4,175			
Low Ctrl	E3	0,605	1,002	1,024	0,031	3,0
	F3	0,497	1,046			
High Ctrl	G3	0,243	4,335	4,315	0,029	0,7
	H3	0,244	4,294			



Charakteristik des Testosteronassays

Proben

Porcines Plasma oder Serum.

Benötigte Vorverdünnung für den Test: 1:20 oder höher. Standard-Konzentrationen wurden für Serum/Plasma-Proben berechnet bei einer Vorverdünnung von 1:50.

Messbereich

0,3 bis 10 ng/ml (50 µl Probe: Serum 1:50 vorverdünnt)

Antiserum wurde gegen Testosteron-3-CMO-BSA im Kaninchen erzeugt.

Endverdünnung 1:1.500.000.

Kreuzreaktionen

Testosteron 100%, 5a-DHT 96%, Androstendion 3%, Progesteron < 0,01%, 17β-Estradiol < 0,01%, Cortisol < 0,02%, Corticosteron < 0,001%.

Intraassay-Variationskoeffizient

6,6% (n=10) porcine Plasmaproben mit 5,8 ng/ml

6,8% (n=10) mit 1,9 ng/ml.

Interassay-Variationskoeffizient

Für eine Zugabe von 0,5; 3,0 and 6,0 ng Testosteron / ml zu steroidfreiem porcinem Plasma:

11,9, 8,8 bzw. 15,8% (n=18).

Wiederfindung (%) von verschiedenen Mengen an Testosteron bei Zugabe zu porcinen Serumproben:

Testosteronzugabe (ng/ml Serum)	0,31	0,63	1,25
Eberserum (zusätzlich 1:50 vorverdünnt)	119	112	100
Weibliches Serum	113	91	92
Steroidfreies Serum (Charcoal)	133	106	98