

Tipps und Tricks für die Durchführung von Enzymimmunoassays (ELISA, EIA)

Testanweisungen von Immunoassays sind immer exakt zu befolgen. Bei Unklarheiten bezüglich des Testprotokolls oder der Durchführung ist es immer besser nachzufragen. Die folgenden Empfehlungen sollten Anwendung finden, solange sie nicht von der Testanweisung ausdrücklich abweichen.

Pipettiertechnik

Proben und Standards sollten immer als Doppelbestimmung angesetzt werden. Eventuelle Fehler im Pipettiervolumen lassen sich zu einem großen Prozentsatz eliminieren, indem alle Doppelbestimmungen mit einem hohen Variationskoeffizienten (CV) als falsch angesehen und wiederholt werden.

Beim Pipettieren von Volumina ab 20 µl ist reverses Pipettieren in der Regel vorzuziehen.

Normales Pipettieren: Pipette bis zum 1. Druckpunkt drücken – Flüssigkeit aufnehmen – gesamte Flüssigkeit abgeben (über den 1. Druckpunkt hinaus).

Das wiederholte Pipettieren der gleichen Probe ist allerdings nur dann genau, wenn entweder zwischen jedem Pipettieren die Spitze erneuert wird oder diese vor dem ersten Gebrauch einmal benetzt wird.

Reverses Pipettieren: Pipette etwas über den 1. Druckpunkt hinaus drücken – Flüssigkeit aufnehmen – Flüssigkeit genau bis zum 1. Druckpunkt abgeben (= definiertes Volumen) – Pipette gedrückt halten und neue Flüssigkeit aufnehmen – nächstes Well/Gefäß bis zum 1. Druckpunkt füllen - etc

Vorteile: - geringere Variation

- keine Blasenbildung bei Abgabe der Flüssigkeit.

- bei Mehrfachpipettieren der gleichen Probe genauer, einfacher und schneller

Nachteil: durch das in der Spitze verbleibende Totvolumen wird ein etwas höheres Reagenzvolumen benötigt.

Achtung!

Nie den Pipettiermodus innerhalb eines Arbeitsganges wechseln.

(wenn z.B. die Standards revers pipettiert werden, müssen es die Proben und Kontrollen auch)

Das pipettierte Volumen kann sich zwischen beiden Methoden ein wenig unterscheiden.

Das Pipettieren von kleinen Probenvolumina (< 50 µl) aus tiefen Probengefäßen birgt die große Gefahr der verstärkten Außenkontamination der Pipettenspitze mit Probentröpfchen. Gelangen diese zusätzlichen Tropfen dann in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte, führt dies zu erhöhten Variationen im Test.

Kleine Probengefäße (z.B. Eppendorfgeläße) sind gegenüber Röhren vorzuziehen.

Verwendung von Mehrkanalpipetten

Einkanal-Multipipetten und -Stepper mit oder ohne zusätzlicher Spitze sind zum Pipettieren von Antikörper-, Enzym- und Substratlösungen nicht sehr geeignet. Mehrkanalpipetten schneiden in Bezug auf Pipettiergenauigkeit und Pipettierzeit besser ab. Den einzigen Nachteil, den sie besitzen, ist ein etwas höherer Reagenzbedarf (Benetzung der Pipettierschale, Totvolumen beim reversen Pipettieren). In unseren Testkits ist die Reagenzmenge ausreichend bemessen.

Schütteln von Testplatten

Nach dem Pipettieren von Mikrotiterplatten sollten diese kurz auf dem Plattenschüttler geschüttelt werden. (Rotierender Horizontalschüttler/Orbitalschüttler mit kleiner Auslenkung, z.B. 1,5 mm)
Insbesondere bei kurzen Inkubationszeiten verbessert ein Schütteln während der Inkubation normalerweise das Testergebnis, sofern es die Testanweisung nicht verbietet.

Licht

Direktes Sonnenlicht ist beim Pipettieren und während der Inkubation zu vermeiden. Manche Parameter (Proteine, Antikörper, Peroxidase) reagieren darauf sehr empfindlich.
Kunstlicht schadet meist nicht, da es bei weitem nicht so intensiv und kurzweilig ist.

Temperatur

Die Reagenzien sollen bei der Testdurchführung Raumtemperatur haben. Hierzu holt man den Testkit am besten eine Tag vor Gebrauch aus dem Kühlschrank. Die Haltbarkeit, die meist mehrere bis viele Monate beträgt, wird dadurch nicht beeinflusst. Wasser zur Verdünnung von Pufferkonzentraten muss früh genug temperiert werden. Es gibt Testkits, die hiervon abweichen, was dann unbedingt befolgt werden muss.
Stärkere Temperaturveränderungen sind bei der Testdurchführung unbedingt zu vermeiden, da sich dann in der Mikrotiterplatte von außen nach innen ein Temperaturgradient bildet, was eine unterschiedliche Reaktionsgeschwindigkeit zur Folge hat.

Tests, die im Kühlschrank inkubieren, dürfen vor dem nächsten Arbeitsschritt nicht wieder auf Raumtemperatur gebracht werden. Ein zügiges Arbeiten ist hier besonders wichtig. Ein vorgegebenes Arbeiten mit kalten Lösungen muss konsequent eingehalten werden.

Abdecken der Platten

Mikrotiterplatten müssen nach dem Pipettieren immer abgedeckt gehalten werden.

Klebefolien sind nicht besonders geeignet. Viel besser zu handhaben sind Kunststoffdeckel der Plattenhersteller (z.B. Nunc, Corning-Costar). Sie lassen sich viele Jahre wiederverwenden.

Während der Inkubation sollten die abgedeckten Platten in normale Haushalts-Alufolie eingeschlagen werden. Diese kann auch mehrfach wiederverwendet werden.

Vorteile:

- beste Lichtabschirmung
- der Temperatureausgleich zwischen einzelnen Vertiefungen der Platte ist bedeutend besser
- Verminderung der Verdunstung von Flüssigkeit

Sprechen und starke Kopfbewegungen (Kopfschütteln) sollten beim Hantieren mit nicht abgedeckten Mikrotiterplatten unbedingt vermieden werden. Speicheltropfen und Körperschuppen haben bei manchen Tests (Testschritten) eine fatale Wirkung.

Zeit

Vorgegebene Inkubationszeiten sind immer einzuhalten.

Wenn andere Inkubationszeiten z.B. aus technischen Gründen notwendig sind, dann nur nach Rücksprache.

Wichtig ist es, die Zeit zwischen einzelnen Arbeitsschritten so kurz wie möglich zu halten. Ein vollständiges Austrocknen der Mikrotiterplatten zwischen zwei Inkubationsschritten wird sich meist negativ auswirken.

Die Messung nach dem Abstoppen der Substratreaktion sollte immer zügig durchgeführt werden, auch wenn die Testanleitung einen gewissen Zeitraum bis zur Messung erlaubt. Besser wird das Ergebnis während der Standzeit garantiert nicht!

Probenschütteln

Insbesondere eingefrorene Proben müssen vor Gebrauch ausreichend geschüttelt werden. (Vortex)

Eine Schaumbildung ist möglichst zu vermeiden.

Bei manchen Parametern ist nur ein leichtes Überkopfdrehen der Proben/Standards erlaubt (Testbeschreibung beachten!)

Waschen der Mikrotiterplatten

Beim Waschen von Mikrotiterplatten ist die Verwendung eines automatischen Waschgerätes manuellen Methoden in der Regel vorzuziehen.

Äußerst wichtig ist es, dass der Washer möglichst bald nach Gebrauch mit demineralisiertem Wasser gespült wird, um ein Zusetzen der Waschnadeln und eine Verunreinigung der Pumpe durch Kristallisation zu vermeiden. Eine Washer-Fehlfunktion aus diesen Gründen ist kein Garantiefall!

Für manuelles Waschen sind 1-Kanal-Multipipetten und Mehrkanalpipetten ziemlich ungeeignet, weil die Verwendung sehr zeitaufwendig und anstrengend ist. Es gibt im Laborhandel günstig 8-Kanal-Spritzenvorsätze, die diese Arbeit erheblich erleichtern. Dass sich mit diesen Vorsätzen das Waschvolumen nicht so genau dosieren lässt, spielt absolut keine Rolle, solange die Vertiefungen ausreichend mit Waschpuffer gefüllt werden.

Nach dem letzten Waschschrift müssen die Platten auf einer saugfähigen Papierunterlage gut ausgeklopft werden.

Extinktionsmessung

Die Messwellenlänge muss sehr genau eingehalten werden. Diese Messung findet beim Absorptionsmaximum des jeweiligen Farbstoffs statt:

- pNPP 405 nm
- TMB (abgestoppt) 450 nm

Zusätzlich sollte immer eine Referenzmessung bei einer Wellenlänge durchgeführt werden, bei der der Farbstoff keine Absorption zeigt. Dies ist bei beiden Farbstoffen bei Wellenlängen größer als 550 nm der Fall, sodass ein beliebiger Messfilter zwischen 590 und 650 nm verwendet werden kann.

Die Extinktion der Referenzmessung wird von dem Wert der Messwellenlänge substrahiert. Hiermit können leichte Fehler durch z.B. eine leichte, meist nicht sichtbare Verschmutzung der Mikrotiterplatte reduziert werden. Die Variation der Testergebnisse wird so deutlich verkleinert.

Alle aktuellen und fast alle älteren Reader bieten die Möglichkeit der automatischen Referenzmessung (dual wave length measurement, dichromatic measurement, second wave length). Die Berechnung der Werte übernimmt die Software automatisch.