

Arbeitsanleitung / Manual

GABA ELISA Kit

***Zur Bestimmung von GABA in humanem EDTA-Plasma, Serum
und Urin***

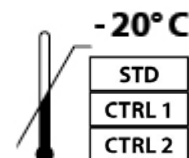
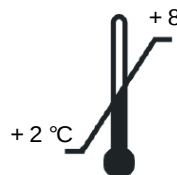
***For the determination of GABA in human EDTA plasma, serum
and urine***

Nur zu Forschungszwecken / For research use only

Gültig ab / Valid from 08.07.2011



K 7012



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, D 64625 Bensheim
Tel.: ++49 6251 70190-0
Fax: ++ 49 6251 849430
e.mail: Info@immundiagnostik.com
www.immundiagnostik.com

Inhaltsverzeichnis / table of contents	Seite / page
1. VERWENDUNGSZWECK	3
2. TESTPRINZIP	3
3. INHALT DER TESTPACKUNG	4
4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	4
5. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN	5
6. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN	6
7. PROBENVORBEREITUNG	6
8. TESTDURCHFÜHRUNG	7
<i>PIPETTIERSCHEMA PROBENVORBEREITUNG</i>	7
<i>PIPETTIERSCHEMA TESTDURCHFÜHRUNG</i>	8
9. AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE	9
<i>ERWARTETE ERGEBNISSE</i>	12
10. TESTCHARAKTERISTIKA	12
<i>KREUZREAKTION</i>	12
<i>PRÄZISION UND REPRODUZIERBARKEIT</i>	12
<i>SENSITIVITÄT</i>	13
<i>WIEDERFINDUNG</i>	13
<i>LINEARITÄT</i>	13
<i>KORRELATION MIT HPLC-MS</i>	14
11. EINSCHRÄNKUNGEN	14
12. LITERATUR	15
13. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	15

1. INTENDED USE	18
2. PRINCIPLE OF THE TEST	18
3. MATERIAL SUPPLIED	19
4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	19
5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS	20
6. PRECAUTIONS	21
7. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION	21
8. ASSAY PROCEDURE	21
<i>SAMPLE PREPARATION PROCEDURE</i>	22
<i>TEST PROCEDURE</i>	23
9. EVALUATION OF RESULTS	24
<i>EXPECTED RESULTS</i>	26
10. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	27
<i>CROSS REACTIVITY</i>	27
<i>PRECISION AND REPRODUCIBILITY</i>	27
<i>SENSITIVITY</i>	27
<i>RECOVERY</i>	28
<i>LINEARITY</i>	28
<i>CORRELATION WITH HPLC-MS</i>	29
11. LIMITATIONS	29
12. REFERENCES	29
13. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	30

1. VERWENDUNGSZWECK

Dieser ELISA-Test ist für die Bestimmung von γ -Aminobuttersäure (GABA) in humanem EDTA-Plasma, Serum und Urin geeignet. Nur zu Forschungszwecken.

2. TESTPRINZIP

Der Test basiert auf der Methode des kompetitiven Enzymimmunoassays. Zur Vorbereitung wird die zu untersuchende Probe mit einem Derivatisierungsreagenz zur Derivatisierung des enthaltenen GABA versetzt. Anschließend wird die so vorbereitete Probe zusammen mit dem Assayreagenz, welches GABA-Derivat (Tracer) enthält, in einer ELISA-Platte inkubiert, die mit einem polyklonalen Antikörper gegen GABA-Derivat beschichtet ist. Während der Inkubation kompetitiert das Zielantigen in der Probe mit dem Tracer um die Bindung an die polyklonalen Antikörper. Hierbei verdrängt das Zielantigen in der Probe den Tracer aus der Bindung an den Antikörper. Daher ist die Konzentration des an den Antikörper gebundenen Tracers umgekehrt proportional zu der Konzentration des Zielantigens in der Probe.

Beim zweiten Inkubationsschritt wird ein Peroxidase-Konjugat zugegeben, welches an den Tracer bindet. Nach einem Waschschrift zur Entfernung ungebundener Komponenten wird das Peroxidasesubstrat Tetramethylbenzidin (TMB) zugegeben. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von Säure abgestoppt. Dadurch erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die entstandene chromogene Verbindung wird photometrisch bei 450 nm gemessen. Die Intensität der Farbe ist umgekehrt proportional zur Konzentration des gemessenen Analyten, d.h. mit steigender Konzentration von GABA in der Probe reduziert sich die Konzentration des an den Antikörper gebundenen Tracers und das Signal nimmt ab. Parallel dazu wird eine Standardkurve – optische Dichte (Absorption bei 450 nm) versus Standardkonzentration – erstellt, aus der die Konzentrationen der Proben (EDTA-Plasma und Serum) ermittelt werden. Bei Urinproben werden die Ergebnisse der ELISA-Auswertung anhand der Kreatininkonzentration des Urins normiert. Es muss daher eine parallele Kreatininbestimmung durchgeführt werden.

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Artikel Nr.	Inhalt	Kit Komponenten	Menge
K7012MTP	PLATE	Mikrotiterplatte, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K7012ST	STD	Standards, vorverdünnt in Reaktionspuffer (gebrauchsfertig)	6 x 1 Fläschchen
K7012KO1 K7012KO2	CTRL 1 CTRL 2	Kontrollen, vorverdünnt in Reaktionspuffer (gebrauchsfertig)	2 x 1 Fläschchen
K7012WP	WASHBUF	Waschpufferkonzentrat (10-fach)	2 x 100 ml
K7012AR	ASYREAG	Assayreagenz (lyophilisiert)	3 x 1 Fläschchen
K7012K	CONJ	POD-Konjugat (Konzentrat)	120 µl
K7012KV	CONJBUF	Konjugatstabilisierungspuffer	24 ml
K7012RP	DERBUF	Reaktionspuffer	2 x 25 ml
K7012DR	DER	Derivatisierungsreagenz	3 x 1 Fläschchen
K7012LM	DMSO	Dimethylsulfoxid (DMSO)	2 ml
K7012SL	CODIL	Verdünnungspuffer nach Derivatisierung	28 ml
K7012TMB	SUB	TMB-Substrat	25 ml
K7012AC	STOP	Stopplösung	15 ml

4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Bidestilliertes Wasser (aqua bidest.)
- Präzisionspipetten und Einmalpipettenspitzen mit variablen Volumina von 10 - 1000 µl
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Zentrifuge, 10000 x g
- Vortex-Mixer
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenphotometer mit Filter 450 nm (Referenzfilter 620 oder 690 nm)

5. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz der Platte darauf, dass die Reagenzien wie in der Vorschrift beschrieben gelagert und **nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden**. Der Kit kann so je nach Probenaufkommen bis zu 3x bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100 µl** sollten vor Gebrauch zentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.
- Das **Waschpufferkonzentrat (WASHBUF)** muss vor Gebrauch **1:10** in bidestilliertem Wasser (aqua bidest.) verdünnt werden (**100 ml WASHBUF + 900 ml aqua bidest.**); gut mischen. Aufgrund der hohen Salzkonzentration in den Stammlösungen kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur bzw. im Wasserbad bei 37°C auf. Das Pufferkonzentrat kann bei **2-8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Die verdünnte Pufferlösung ist bei **2-8°C einen Monat** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- Die **Standards (STD)** und die **Kontrollen (CTRL1, CTRL2)** sind bereits in Reaktionspuffer (DERBUF) verdünnt und werden bei **-20°C** gelagert. Für den Test werden die Standards und Kontrollen aufgetaut und können bis zu 3x wieder eingefroren werden. Das Wiedereinfrieren der Standards und Kontrollen sollte sofort nach Entnahme erfolgen.
- **DMSO** kristallisiert bei 4°C aus. Zum Lösen das DMSO im Wasserbad bei 20-25°C erwärmen.
- Der Inhalt eines Fläschchens **Derivatisierungsreagenz (DER)** wird in **550 µl DMSO** gelöst und das Fläschchen für 5 min auf einen Horizontalschüttler gelegt. Nach Gebrauch ist das Restreagenz zu verwerfen. Das DER sollte **unmittelbar vor Gebrauch frisch angesetzt** werden. Durch die Aufteilung des DER in 3 Gefäße ist der ELISA in drei Ansätze teilbar. Bitte beachten: DMSO greift Plastik an, DMSO reagiert nicht mit Polypropylen-Produkten und Glasgefäßen.
- Der Inhalt eines Fläschchens **Assayreagenz (ASYREAG)** wird in **4 ml verdünntem Waschpuffer** gelöst. Durch die Aufteilung des ASYREAG in 3 Gefäße ist der ELISA in drei Ansätze teilbar. Gelöstes Assayreagenz kann **4 Wochen bei -20°C** aufbewahrt werden.
- Das **Peroxidase-Konjugat (CONJ)** wird **1:200** in Konjugatstabilisierungspuffer (CONJBUF) verdünnt (**z.B. 110 µl CONJ + 22 ml CONJBUF; nur die**

benötigte Menge ansetzen). Unverdünntes Konjugat ist bei 2-8°C bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. Verdünntes Konjugat ist bedingt stabil und kann **5 Tage bei 2-8°C** aufbewahrt werden.

- Alle anderen Testreagenzien sind bei 2-8°C zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

6. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

- Nur zu Forschungszwecken.
- Standards und Kontrollen sind teilweise auf Humanplasma aufgebaut. Sie sind auf HIV und Hepatitis B getestet und für negativ befundet worden. Jedoch sollten die Testkomponenten immer wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.
- Die Stopplösung besteht aus verdünnter H_2SO_4 . H_2SO_4 ist eine starke Säure und muss auch im verdünnten Zustand mit Vorsicht verwendet werden. H_2SO_4 verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Schwefelsäure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des angegebenen Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.

7. PROBENVORBEREITUNG

EDTA-Plasma, Serum und Urin

- Als Probe eignet sich venöses Nüchternblut und Morgenurin. Die Haltbarkeit der Blutprobe beträgt bei 2-8°C eine Woche. Im Urin ist GABA über 72 h bei Raumtemperatur stabil. Die Urinprobe kann daher ungekühlt versendet werden. Zur längeren Lagerung sollten die Blut- und Urin-Proben bei -20°C aufbewahrt werden. Wir empfehlen ein Ansäuern der Urinprobe.
- Lipämische und hämolytische Proben beeinflussen das Testergebnis und sollten nicht verwendet werden.
- EDTA-Plasma-, Serum- und Urinproben werden für die Derivatisierung vorverdünnt.

Proben mit sichtbaren Mengen an **Feststoff** (meist Kryoproteine) sollten vor Einsatz mind. 5 min bei 10000 x g **zentrifugiert** werden. Der resultierende Überstand wird im Test eingesetzt.

- Zur weiteren Vorbereitung muss die Probe mit einem Derivatisierungsreagenz (DER) zur Derivatisierung des enthaltenen GABA versetzt werden (Details siehe Pipettierschema Probenvorbereitung).

8. TESTDURCHFÜHRUNG

Hinweise

- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Inkubationszeit, Temperatur und Pipettiervolumina sind vom Hersteller festgelegt. Jegliche Abweichung der Testvorschrift, die nicht mit dem Hersteller koordiniert wurde, kann zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Immundiagnostik AG übernimmt keine Haftung.
- Die Bestimmung ist immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.

Pipettierschema Probenvorbereitung

Die Derivatisierung der Standards (STD), der Kontrollen (CTRL) und der verdünnten Proben (SAMPLE) wird als Einzelbestimmung in Mikroreaktionsgefäßen durchgeführt.

EDTA-Plasma und Serumproben werden im **Faktor 1:4** vorverdünnt. Dafür werden jeweils **100 µl** Probe mit **300 µl** Reaktionspuffer (DERBUF) verdünnt. Diese Reaktionsgefäße mit 400 µl verdünnter Probe werden direkt für die Derivatisierung verwendet (siehe Pipettierschema Punkt 2.)

Urinproben werden im **Faktor 1:50** vorverdünnt. Dafür werden jeweils **20 µl** Probe mit **980 µl** Reaktionspuffer (DERBUF) verdünnt. Davon werden **400 µl** entnommen und für die Derivatisierung verwendet (siehe Pipettierschema Punkt 2.)

- | | |
|----|---|
| 1. | Im Test dürfen nur Reagenzien und Proben verwendet werden, welche Raumtemperatur (18-26°C) aufweisen. |
| 2. | Je 400 µl gebrauchsfertiger Standard (STD) bzw. 400 µl gebrauchsfertige Kontrollen (CTRL) bzw. 400 µl vorverdünnte Probe (SAMPLE) in Mikroreaktionsgefäße pipettieren. |

3. **25 µl** frisch angesetztes **Derivatisierungsreagenz (DER)** in **alle Reaktionsgefäße** (Standards, Kontrollen und Proben) pipettieren, gut mischen und auf einem Horizontalschüttler (180-240 rpm) **60 min bei Raumtemperatur (18-26°C)** inkubieren.
4. Anschließend in alle verwendeten Mikroreaktionsgefäße **500 µl Verdünnungspuffer (CODIL)** zugeben, gut mischen und auf einem Horizontalschüttler (180-240 rpm) **30 min bei Raumtemperatur (18-26°C)** inkubieren.

2 x 100 µl der so vorbereiteten Proben (STD, CTRL, SAMPLE) werden im ELISA als Doppelbestimmung eingesetzt.

Pipettierschema Testdurchführung

5. Positionen für Standard/ Kontrolle/ Probe (STD/ CTRL/ SAMPLE) in Doppelbestimmung am Protokollblatt markieren.
6. Die benötigten Streifen der Mikrotiterplatte (PLATE) aus dem Kit nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterplattenstreifen können abgeklebt bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2-8°C gelagert werden.
7. Mikrotiterplattenstreifen **5 x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer** waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch mehrmaliges Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
8. **2 x 100 µl der vorbereiteten derivatisierten Proben (STD, CTRL, SAMPLE)** werden aus den Mikroreaktionsgefäßen in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte (PLATE) pipettiert.
9. **100 µl** gelöstes **Assayreagenz (ASYREAG)** pro Vertiefung pipettieren. Streifen luftdicht abdecken.
10. Über Nacht (**15-20 Stunden**) bei **2-8°C** inkubieren.
11. Inhalt der Platte verwerfen und **5 x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer** waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch mehrmaliges Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.

12. 200 µl verdünntes Peroxidase-Konjugat (CONJ) in alle Vertiefungen pipettieren.
13. Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (18-26°C) unter Schütteln (180-240 rpm) inkubieren.
14. Inhalt der Platte verwerfen und 5x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch mehrmaliges Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
15. 200 µl TMB-Substrat (SUB) in alle Vertiefungen pipettieren.
16. 6-12 min bei Raumtemperatur (18-26°C) im Dunkeln inkubieren*
17. 100 µl Stopplösung (STOP) in alle Vertiefungen pipettieren und im Mikrotiterplattenphotometer im Schüttelmodus mischen.
18. Extinktion sofort im Mikrotiterplattenphotometer mit einer Messwellenlänge von 450 nm messen. Sofern die höchste Extinktion der Standards (STD) den Messbereich des Photometers übersteigt, sollte die Messung sofort bei einer Messwellenlänge von 405 nm wiederholt und diese Ergebnisse für eine Auswertung herangezogen werden. Wenn möglich, sollten bei jeder Messung die Extinktionen der Messwellenlänge mit den Extinktionen einer Referenzwellenlänge verglichen werden. Zulässige Referenzwellenlängen sind z.B.: 595 nm, 620 nm, 630 nm, 650 nm und 690 nm.

* Die Intensität der Farbentwicklung ist temperaturabhängig. Es wird empfohlen, den Farbumschlag während der Inkubationszeit zu beobachten und entsprechend der Farbentwicklung die Reaktion zu stoppen.

9. AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Bei einer Durchführung des Tests unter strikter Einhaltung der Volumenangaben für Standards, Kontrollen und Probenbehandlung sind Standards, Kontrollen sowie Plasma- bzw. Serumproben gleich verdünnt, deshalb wird bei der Auswertung der Ergebnisse **für Serum und Plasma kein Verdünnungsfaktor mitberechnet**.

Bei einer **1:50 Verdünnung der Urinproben** muss das Ergebnis mit dem Faktor 12,5 multipliziert werden. Die ermittelte Konzentration wird auf den Kreatiningehalt der Urinproben bezogen.

$$GABA \left[\frac{\mu g}{g_{Kreatinin}} \right] = \text{Verdünnungsfaktor} \times \frac{c_{GABA} \left[\frac{\mu mol}{l} \right]}{c_{Kreatinin} \left[\frac{mmol}{l} \right]} \times \frac{MW_{GABA} \left[\frac{g}{mol} \right]}{MW_{Kreatinin} \left[\frac{g}{mol} \right]}$$

Oder vereinfacht: der sich daraus ergebende Umrechnungsfaktor von 11395 wird mit der Konzentration an GABA [$\mu\text{mol/l}$] multipliziert und durch die Konzentration an Kreatinin [mmol/l] geteilt:

$$GABA \left[\frac{\mu g}{g_{Kreatinin}} \right] = 11395 \times \frac{c_{GABA} \left[\frac{\mu mol}{l} \right]}{c_{Kreatinin} \left[\frac{mmol}{l} \right]}$$

Auswertungsfunktionen

Die unten beschriebenen mathematischen Modelle können alternativ zur Auswertung benutzt werden. Wir empfehlen die 4-Parameter-Funktion.

1. 4-Parameter-Funktion

Für die optische Dichte empfehlen wir eine lineare Ordinate und für die Konzentration eine logarithmische Abszisse (bei einer logarithmischen Abszisse muss für den Standard mit der Konzentration 0 ein Wert kleiner 1 eingegeben werden, wir empfehlen 0,001).

2. Punkt-zu-Punkt-Auswertung

Für die optische Dichte und für die Konzentration empfehlen wir eine lineare Ordinate bzw. Abszisse.

3. Gewichtete Spline-Funktion

Für die optische Dichte empfehlen wir eine lineare Ordinate und für die Konzentration eine logarithmische Abszisse (bei einer logarithmischen Abszisse muss für den Standard mit der Konzentration 0 ein Wert kleiner 1 eingegeben werden, z.B. 0,001).

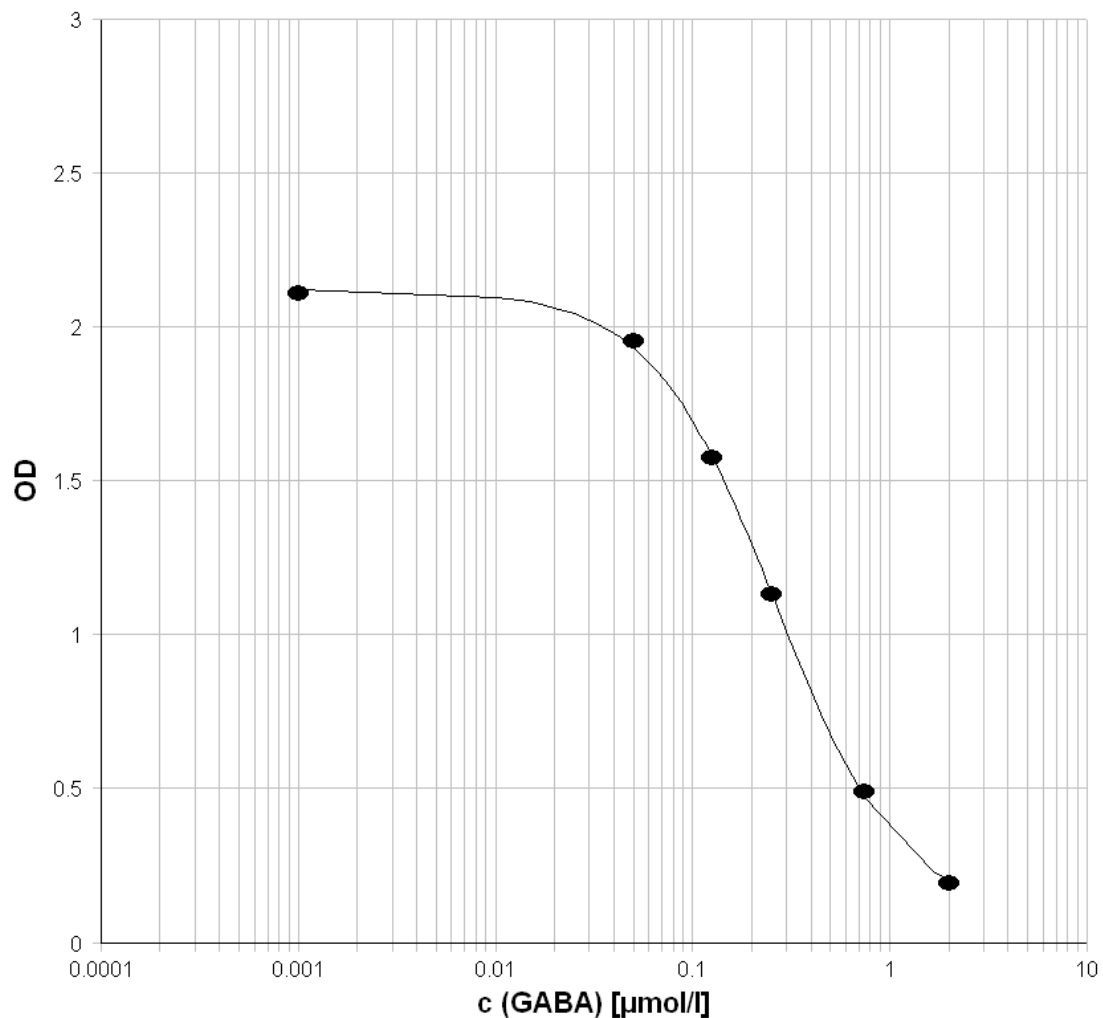
Vor jeder automatischen Auswertung sollte stets eine Kontrolle der Doppelwerte auf Plausibilität („Ausreißerkontrolle“) durchgeführt werden; falls dies nicht durch das verwendete Programm erfolgt, sollte die Kontrolle manuell durchgeführt werden.

Kontrollen

Zur Überwachung der Qualität der Analyse sollten bei jedem Testansatz Kontrollen mitgeführt werden. Die Ergebnisse der Kontrollen müssen auf Richtigkeit überprüft werden. Liegen ein oder mehrere Werte außerhalb des angegebenen Bereiches, ist es möglich, dass auch die Patientenproben falsch ermittelt wurden.

Die Konzentrationen der Kontrollen und Patientenproben können direkt aus der Kalibrierkurve in $\mu\text{mol/l}$ abgelesen werden. Die folgende Abbildung zeigt ein typisches Beispiel einer Standardkurve. Sie darf nicht zur Auswertung der Messwerte benutzt werden.

Musterkalibrierkurve



Erwartete Ergebnisse

Anhand einer laborinternen Studie mit Plasma-Proben von augenscheinlich Gesunden (n=20) wurde ein Mittelwert von 0,182 µmol/l ermittelt, bei einer Standardabweichung von 0,053 µmol/l.

Plasma-Mittelwert ± 2 Standardabweichungen: **0,182 ± 0,106 µmol/l**

Normalbereich: **0,076 – 0,288 µmol/l**

Wir empfehlen jedem Labor, seinen eigenen Normalwerte-Bereich zu erstellen, weil Referenzbereiche stark von der Auswahl des Probandenkollektivs abhängig sind. Die Angabe des Normalbereichs dient lediglich der Orientierung und kann von anderen publizierten Daten abweichen.

10. TESTCHARAKTERISTIKA

Kreuzreaktion

β-Alanin	< 0,4 %
α-Aminobuttersäure	< 0,01 %

Präzision und Reproduzierbarkeit

EDTA-Plasma

Intra-Assay (n=12)		
Probe	GABA [µmol/l]	Variationskoeffizient (CV) [%]
1	0,122	7,1
2	0,197	9,2

Inter-Assay (n=6)		
Probe	GABA [µmol/l]	Variationskoeffizient (CV) [%]
1	0,089	13,5
2	0,420	8,0

Sensitivität

Die Nachweisgrenze wurde als $B_0 + 2 \text{ SD}$ festgelegt. Gemessen wurde 48 Mal der Standard Null.

Probe	GABA Mittelwert [OD]	2 Standard- abweichungen (2 x SD)	Nachweis- grenze [μmol/l]
Standard Null	2,28	0,18	0,024

Wiederfindung

Unterschiedliche Mengen an GABA wurden zu einer Plasmaprobe gegeben (Spike) und anschließend im ELISA gemessen. Die analytische Wiederfindung von GABA wurde bei 2 verschiedenen Konzentrationen aus den theoretisch erwarteten und den praktisch gemessenen Werten ermittelt. Die theoretisch erwarteten Werte wurden dabei aus der Summe der gemessenen Konzentration in der Probe ohne Spike und der zugegebenen Menge ermittelt. Die mittlere Wiederfindung für alle Konzentrationen der Plasmaprobe betrug 99,5 % (n=10).

Spike [μmol/l]	GABA gemessen [μmol/l]	GABA erwartet [μmol/l]	Wiederfindung [%]
0	x = 0,104	x	100,0
0,15	0,252	0,104+0,15 = 0,254	99,2
0,3	0,401	0,104+0,3 = 0,404	99,3

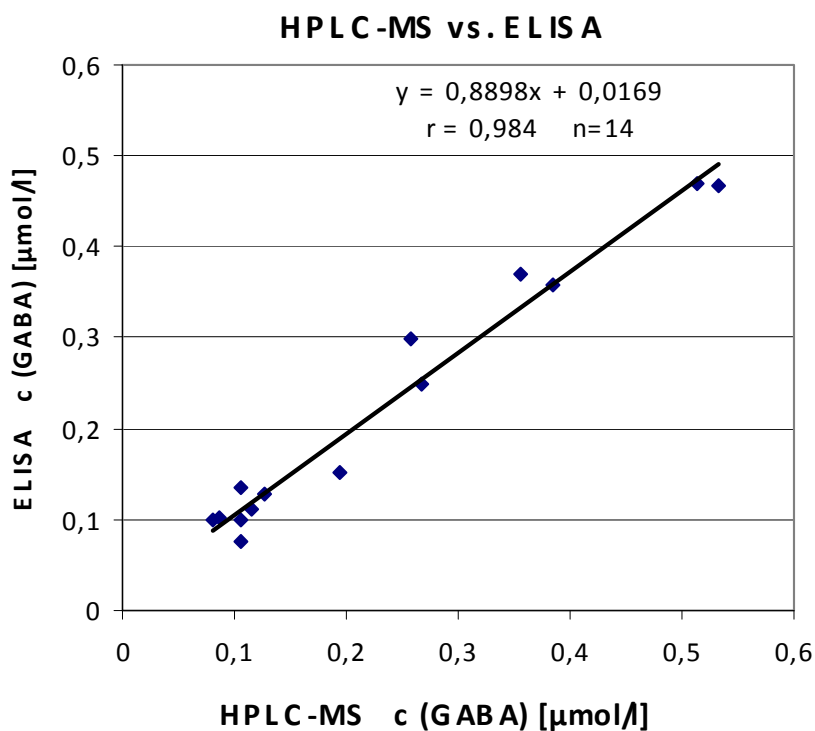
Linearität

Die Linearität des ELISAs wurde durch Verdünnen einer aufgestockten Plasmaprobe bestimmt. Die mittlere Linearität betrug 107 % (n=10).

Verdünnung	Messwert [μmol/l]	Erwartet [μmol/l]	Wiederfindung [%]
original	0,478	0,478	100,0
1+1	0,252	0,239	105,4
1+3	0,138	0,120	115,5

Korrelation mit HPLC-MS

Die Korrelation mit HPLC-MS wurde anhand von 14 Proben ermittelt, sie betrug $r = 0,984$.



11. EINSCHRÄNKUNGEN

Stark hämolysierte oder lipämische Proben können zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Wir empfehlen, solche Proben nicht zu analysieren.

12. LITERATUR

- Arrúe A, Dávila R, Zumárraga M, Basterreche N, González-Torres MA, Goienetxea B, Zamalloa MI, Anguiano JB, Guimón J: GABA and homovanillic acid in the plasma of Schizophrenic and bipolar I patients. *Neurochem Res.* 2010 Feb;35(2):247-53.
- Cai HL, Zhu RH, Li HD, Zhang XH, Hu L, Yang W, Ye HS: Elevated plasma γ -aminobutyrate/glutamate ratio and responses to risperidone antipsychotic treatment in schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2010 Oct 1;34(7):1273-8. Epub 2010 Jul 15.
- Küçükibrahimoğlu E, Saygin MZ, Calışkan M, Kaplan OK, Unsal C, Gören MZ: The change in plasma GABA, glutamine and glutamate levels in fluoxetine- or S-citalopram-treated female patients with major depression. *Eur J Clin Pharmacol.* 2009 Jun;65(6):571-7.
- Vaiva G, Boss V, Ducrocq F, Fontaine M, Devos P, Brunet A, Laffargue P, Goudemand M, Thomas P: Relationship between posttrauma GABA plasma levels and PTSD at 1-year follow-up. *Am J Psychiatry.* 2006 Aug;163(8):1446-8.

13. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Reagenzien dieser Testpackung enthalten organische Lösungsmittel. Berührungen mit der Haut oder den Schleimhäuten sind zu vermeiden.
- Sämtliche in der Testpackung enthaltene Reagenzien dürfen ausschließlich zu Forschungszwecken eingesetzt werden.
- Die Reagenzien sollten nach Ablauf des angegebenen Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden (Haltbarkeitsdatum siehe Testpackung).
- Einzelkomponenten mit unterschiedlichen Lot-Nummern aus verschiedenen Testpackungen sollten nicht gemischt oder ausgetauscht werden.
- Für die Qualitätskontrolle sind die dafür erstellten Richtlinien für medizinische Laboratorien zu beachten.
- Die charakteristischen Testdaten wie Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten und der Aufbereitung der Proben wurden firmenintern festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immunodiagnostik AG übernimmt für direkt daraus resultierende Schäden und Folgeschäden keine Haftung.

Verwendete Symbole:

Temperaturbegrenzung



Bestellnummer



Nur für Forschungszwecke

Inhalt ausreichend für <n>
Prüfungen

Hersteller



Verwendbar bis



Chargenbezeichnung

Manual

GABA ELISA Kit

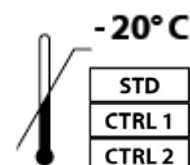
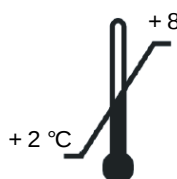
***For the determination of GABA in human EDTA plasma, serum
and urine***

For research use only

Valid from 08.07.2011



K 7012



1. INTENDED USE

The GABA ELISA Kit is intended for the quantitative determination of GABA in human EDTA plasma, serum and urine. It is for research use only.

2. PRINCIPLE OF THE TEST

This assay is based on the method of competitive enzyme linked immunoassays. The sample preparation includes the addition of a derivatization reagent for GABA derivatization. Afterwards, the treated samples are incubated in wells of a microtiter plate coated with a polyclonal antibody against GABA-derivative, together with assay reagent containing GABA-derivative (tracer). During the incubation period the target GABA in the sample competes with the tracer for the binding of the polyclonal antibodies on the wall of the microtiter wells. GABA in the sample displaces the tracer out of the binding to the antibodies. Therefore, the concentration of antibody-bound tracer is inverse proportional to the GABA concentration in the sample.

During the second incubation step, a peroxidase conjugate is added to each microtiter well to detect the tracer. After washing away the unbound components tetramethylbenzidine (TMB) is added as a peroxidase substrate. Finally, the enzymatic reaction is terminated by an acidic stop solution. The color changes from blue to yellow, and the absorbance is measured in a photometer at 450 nm. The intensity of the yellow color is inverse proportional to the GABA concentration in the sample; this means, high GABA concentration in the sample reduces the concentration of antibody-bound tracer and lowers the photometric signal. A dose response curve of absorbance unit (optical density, OD at 450 nm) vs. concentration is generated using the values obtained from the standards. GABA present in the patient samples (serum or EDTA plasma) is determined directly from this curve. For urine samples the ELISA results are normalized to the creatinine concentration in the samples. Therefore, a parallel determination of the creatinine concentration is required.

3. MATERIAL SUPPLIED

Catalog No	Content	Kit Components	Quantity
K7012MTP	PLATE	One holder with precoated strips	12 x 8 wells
K7012ST	STD	Standards diluted in reaction buffer (ready to use)	6 x 1 vial
K7012KO1 K7012KO2	CTRL 1 CTRL 2	Controls diluted in reaction buffer (ready to use)	2 x 1 vial
K7012WP	WASHBUF	Wash buffer concentrate (10-fold)	2 x 100 ml
K7012AR	ASYREAG	Assay reagent (lyophilized)	3 x 1 vial
K7012K	CONJ	POD conjugate (concentrate)	120 µl
K7012KV	CONJBUF	Conjugate stabilizing buffer	24 ml
K7012RP	DERBUF	Reaction buffer	2 x 25 ml
K7012DR	DER	Derivatization reagent	3 x 1 vial
K7012LM	DMSO	Dimethylsulfoxide (DMSO)	2 ml
K7012SL	CODIL	Dilution buffer after derivatization	28 ml
K7012TMB	SUB	TMB substrate	25 ml
K7012AC	STOP	Stop solution	15 ml

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Double distilled water (aqua bidest.)
- Precision pipettors and disposable tips to deliver 10-1000 µl
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- A multi-channel dispenser or repeating dispenser
- Centrifuge capable of 10000 x g
- Vortex-Mixer
- Standard laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader at 450 nm
(reference wave length 620 or 690 nm)

5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- To run assay more than once ensure that reagents are stored at conditions stated on the label. **Prepare only the appropriate amount necessary for each assay.** The kit can be used up to 3 times within the expiry date stated on the label.
- Reagents with a volume less than **100 µl** should be centrifuged before use to avoid loss of volume.
- Dilute the **wash buffer concentrate (WASHBUF)** with aqua bidest. **1:10** before use (**100 ml WASHBUF + 900 ml aqua bidest.**), mix well. Crystals may occur due to high salt concentration in the stock solution. The crystals must be redissolved at room temperature or at 37°C using a water bath before dilution. The WASHBUF is stable at **2-8°C** until the expiry date stated on the label. Diluted buffer solution can be stored in a closed flask at **2-8°C for one month.**
- **Standards (STD) and controls (CTRL1, CTRL2)** are already diluted in reaction buffer (REABUF). Store standards and controls frozen at **-20°C**, thaw before use in the test, and re-freeze immediately after use. Standards and controls can be re-frozen up to 3 times.
- **DMSO** could crystallize at 4°C. Dissolve the crystals at 20-25°C in a water bath.
- Dissolve the content of one vial of **derivatization reagent (DER)** in **550 µl DMSO**. Put the vial on a horizontal shaker for 5 min. Discard any rest of the reagent after use. DER must be **prepared immediately before use.** The ELISA kit can be separated into three performances by providing three DER vials. Please note: DMSO attacks all plastics but not polypropylene products and laboratory glass.
- Dissolve the content of one vial of **assay reagent (ASYREAG)** in **4 ml of diluted wash buffer**. The ELISA kit can be separated into three performances by providing three ASYREAG vials. Dissolved assay reagent can be stored at **-20°C for 4 weeks.**
- Dilute the **POD conjugate (CONJ) 1:200** with conjugate stabilizing buffer (CONJBUF) (**e.g. 110 µl CONJ + 22 ml CONJBUF, prepare only the required amount**). The undiluted POD conjugate is stable at 2-8°C until the expiry date stated on the label. Diluted POD conjugate is not stable over a longer period. It can be stored at **2-8°C for only 5 days.**

- All other test reagents are ready for use. Test reagents are stable until the expiry date (see label of test package) when stored at 2-8°C.

6. PRECAUTIONS

- For research use only.
- Human materials used in kit components were tested and found to be negative for HIV and Hepatitis B. However, for safety reasons all kit components should be treated as if potentially infectious.
- Stop solution is composed of sulfuric acid, which is a strong acid. Even diluted, it still must be handled with care. It can cause acid burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spills should be wiped out immediately with copious quantities of water.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on kit label.

7. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

EDTA plasma, serum and urine

- Venous fasting blood and urine are suited for this test system. Blood samples are stable for one week at 2-8°C. In urine samples GABA is stable for 72 h at room temperature. Therefore urine samples can be sent without cooling. For longer storage, blood and urine samples should be frozen at -20°C. We recommend acidifying the urine samples.
- Lipemic or hemolytic samples may give erroneous results and should not be used for analysis.
- The EDTA plasma, serum and urine samples are diluted for derivatization.
Samples with visible amounts of **precipitates** should be **centrifuged** at least for 5 min at 10000 x g. The resulting supernatant is used in the assay.
- For sample preparation, a derivatization reagent (DER) for derivatization of GABA is added (details are given in the sample preparation procedure).

8. ASSAY PROCEDURE

Procedural notes

- Quality control guidelines should be observed.

- Incubation time, incubation temperature, and pipetting volumes of the different components are defined by the producer. Any variations of the test procedure that are not coordinated with the producer may influence the test results. Immundiagnostik AG can therefore not be held reliable for any damage resulting from this.
- The assay should always be performed according to the enclosed manual.

Sample preparation procedure

Derivatization of standards (STD), controls (CTRL) and diluted samples (SAMPLE) is carried out in single analysis.

Dilute **EDTA plasma and serum samples** with reaction buffer by **factor 1:4**, i.e. **100 µl** sample + **300 µl** reaction buffer (DERBUF). These vials, containing 400 µl diluted sample, are used for derivatization (see step 2.)

Dilute **urine samples** with reaction buffer by **factor 1:50**, i.e. **20 µl** urine sample + **980 µl** reaction buffer (DERBUF). Take out 400 µl for derivatization (see step 2.)

1.	Bring all reagents and samples to room temperature (18-26°C).
2.	Add 400 µl of ready to use standards (STD) , 400 µl of ready to use controls (CTRL) and 400 µl of diluted samples (SAMPLE) in the corresponding vial.
3.	Add 25 µl of freshly prepared derivatization reagent (DER) into each vial (standards, controls and samples), mix well and incubate for 60 min on a shaker (180-240 rpm) at room temperature (18-26°C) .
4.	Afterwards add 500 µl of dilution buffer (CODIL) into each vial, mix well and incubate for 30 min on a shaker (180-240 rpm) at room temperature (18-26°C) .

2 x 100 µl of each treated sample (STD, CTRL, SAMPLE) are used in the ELISA as duplicates.

Test procedure

5.	Mark the positions of standards (STD)/ controls (CTRL)/ samples (SAMPLE) in duplicate on a protocol sheet.
6.	Take as many microtiter strips (PLATE) as needed from kit. Store unused strips covered at 2-8°C. Strips are stable until the expiry date stated on the label.
7.	Wash each well 5 times by dispensing 250 µl of diluted wash buffer into each well. After the final washing step, the inverted microtiter plate (PLATE) should be firmly tapped on absorbent paper to remove excess solution.
8.	For the analysis in duplicate, take 2 x 100 µl of standards (STD) / controls (CTRL) / samples (SAMPLE) out of the vial and add into the respective wells of the microtiter plate (PLATE).
9.	Add 100 µl of dissolved assay reagent (ASYREAG) into each well. Cover the plate tightly.
10.	Incubate overnight (15-20 hours) at 2-8°C .
11.	Aspirate the contents of each well. Wash each well 5 times by dispensing 250 µl of diluted wash buffer into each well. After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper to remove excess solution.
12.	Add 200 µl diluted POD conjugate (CONJ) into each well.
13.	Cover plate tightly and incubate for 1 hour at room temperature (18-26°C) on a horizontal shaker (180-240 rpm).
14.	Aspirate the contents of each well. Wash each well 5 times by dispensing 250 µl of diluted wash buffer into each well. After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper to remove excess solution.
15.	Add 200 µl of TMB substrate (SUB) into each well.

16. Incubate for **6-12 min at room temperature (18-26°C)** in the dark*.
17. Add **100 µl of stop solution (STOP)** into each well, mix thoroughly.
18. Determine **absorption** immediately with an ELISA reader at **450 nm**. If the highest extinction of the standards (**STD**) is above the range of the photometer, absorption must be measured immediately at **405 nm** and the obtained results used for evaluation. If possible, the extinctions from each measurement should be compared with extinctions obtained at a reference wavelength, e. g. 595 nm, 620 nm, 630 nm, 650 nm and 690 nm can be used.

* The intensity of the color change is temperature sensitive. We recommend to observe the color change and to stop the reaction upon good differentiation.

9. EVALUATION OF RESULTS

If the test is performed in strict compliance with the manufacturer's instructions (i.e. with the exact volumes for standards, controls, samples, and with correct sample treatment), standards, controls, and blood samples are equally diluted. Therefore, **no dilution factor is required for the calculation of results from plasma and serum samples.**

For **urine samples** with 1:50 dilution, the values calculated from the calibration curve have to be multiplied by a factor of 12.5 to obtain the true results. The results must be related to the creatinine content of the urine samples.

$$GABA \left[\frac{\mu g}{g_{creatinine}} \right] = dilutionfactor \times \frac{c_{GABA} \left[\frac{\mu mol}{l} \right]}{c_{creatinine} \left[\frac{mmol}{l} \right]} \times \frac{MW_{GABA} \left[\frac{g}{mol} \right]}{MW_{creatinine} \left[\frac{g}{mol} \right]}$$

Or, simplified: the resulting factor of 11395 is multiplied with the concentration of GABA [µmol/l] and divided by the concentration of creatinine [mmol/l]:

$$GABA \left[\frac{\mu g}{g_{creatinine}} \right] = 11395 \times \frac{c_{GABA} \left[\frac{\mu mol}{l} \right]}{c_{creatinine} \left[\frac{mmol}{l} \right]}$$

Calculation of results

The following algorithms can be used alternatively to calculate the results. We recommend using the "4-parameter-algorithm".

1. *4-parameter-algorithm*

It is recommended to use a linear ordinate for optical density and a logarithmic abscissa for concentration. When using a logarithmic abscissa, the zero calibrator must be specified with a value less than 1 (e.g. 0.001).

2. *Point-to-point-calculation*

We recommend a linear ordinate for optical density and a linear abscissa for concentration.

3. *Spline-algorithm*

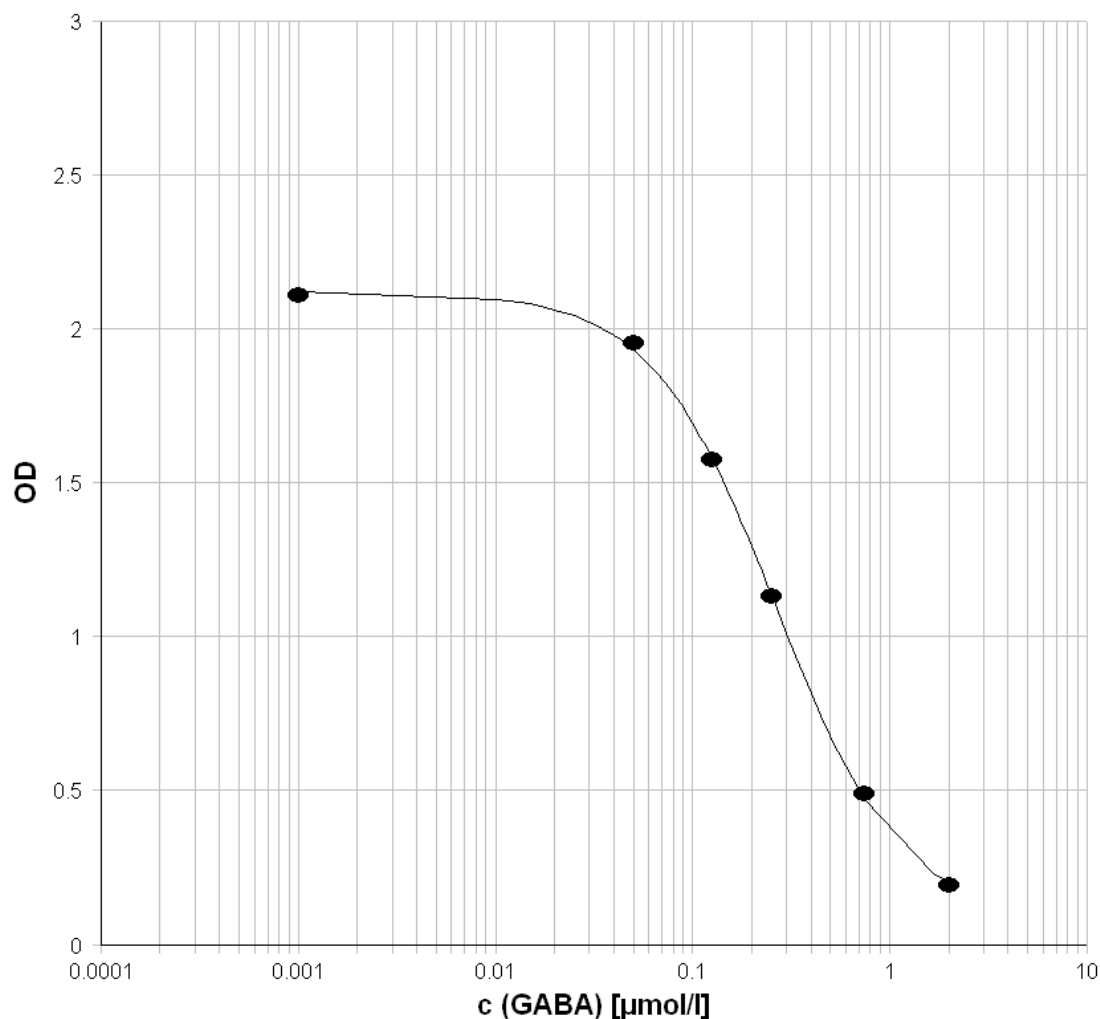
We recommend a linear ordinate for optical density and a logarithmic abscissa for concentration. When using a logarithmic abscissa, the zero calibrator must be specified with a value less than 1 (e.g. 0.001).

Plausibility of the measured pairs of values should be examined before automatically evaluating the results. If this option is not available within the used program, the pairs of values should be controlled manually.

Controls

Control samples or plasma pools should be analyzed with each run. Results generated from the analysis of control samples should be evaluated for acceptability using appropriate statistical methods. The results for the patient samples may not be valid if within the same assay one or more values of the quality control samples are outside the acceptable limits.

The concentration of controls and patient samples can be determined directly from the calibration curve. In the following, an example of a calibration curve is given, do not use it for the calculation of your results.

Example of calibration curve***Expected results***

Based on internal studies with plasma samples of evidently healthy persons (n=20) a mean value of 0.182 µmol/l was calculated. The standard deviation was 0.053 µmol/l.

Plasma mean value $\pm$ 2 x standard deviation: **0.182 $\pm$ 0.106 µmol/l**

Normal range: **0.076 – 0.288 µmol/l**

We recommend each laboratory to develop its own normal range. The values mentioned above are only for orientation and can deviate from other published data.

10. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Cross reactivity

β-alanine	< 0.4 %
α-aminobutyric acid	< 0.01 %

Precision and reproducibility

EDTA plasma:

Intra-assay (n=12)		
sample	GABA [μmol/l]	coefficient of variation (CV) [%]
1	0.122	7.1
2	0.197	9.2

Inter-assay (n=6)		
sample	GABA [μmol/l]	coefficient of variation (CV) [%]
1	0.089	13.5
2	0.420	8.0

Sensitivity

The sensitivity was set as $B_0 + 2SD$. The zero-standard was measured 48 times.

sample	GABA mean value [OD]	2 x standard deviation (SD)	detection limit [μmol/l]
zero-standard	2.28	0.18	0.024

Recovery

One sample was spiked with different GABA concentrations and measured in this assay. The analytical recovery rate was determined by the expected and measured GABA levels. The expected levels were calculated as the sum of the measured GABA concentration in the original sample and the spiked GABA amount. The mean recovery rate for all concentrations was 99.5 % (n=10).

spike [μmol/l]	GABA measured [μmol/l]	GABA expected [μmol/l]	recovery [%]
0	x = 0.104	x	100.0
0.15	0.252	0.104+0.15 = 0.254	99.2
0.3	0.401	0.104+0.3 = 0.404	99.3

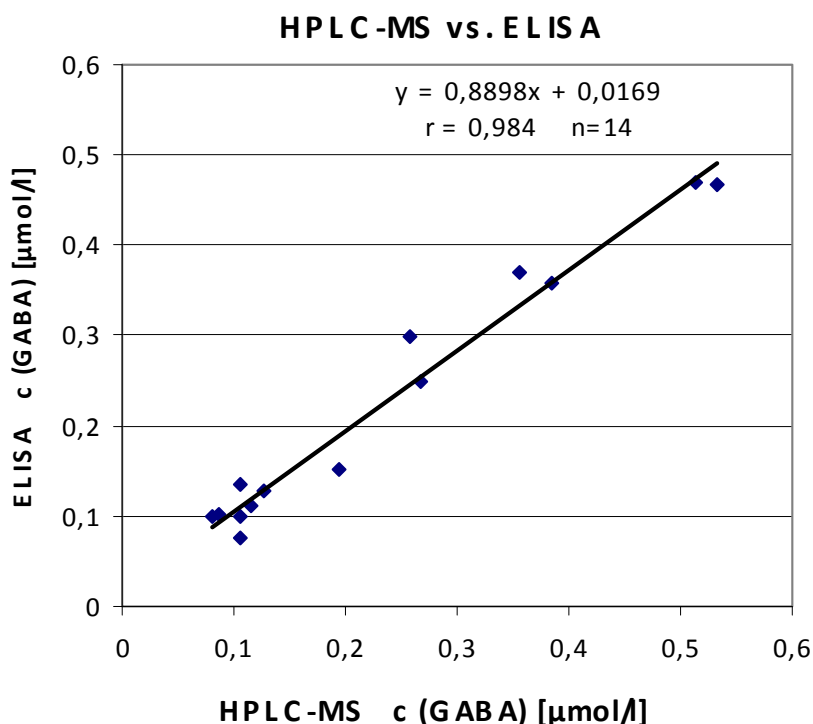
Linearity

The linearity of the ELISA was determined by the dilution of a spiked patient sample. The mean linearity was 107 % (n=10).

dilution	measured [μmol/l]	expected [μmol/l]	recovery [%]
original	0.478	0.478	100.0
1+1	0.252	0.239	105.4
1+3	0.138	0.120	115.5

Correlation with HPLC-MS

14 samples were measured with this ELISA and HPLC-MS. The correlation was $r = 0.984$.



11. LIMITATIONS

Hemolytic and lipemic samples may give erroneous results. Do not measure hemolytic and lipemic samples.

12. REFERENCES

- Arrúe A, Dávila R, Zumárraga M, Basterreche N, González-Torres MA, Goienetxea B, Zamalloa MI, Anguiano JB, Guimón J: GABA and homovanillic acid in the plasma of Schizophrenic and bipolar I patients. *Neurochem Res.* 2010 Feb;35(2):247-53.
- Cai HL, Zhu RH, Li HD, Zhang XH, Hu L, Yang W, Ye HS: Elevated plasma γ -aminobutyrate/glutamate ratio and responses to risperidone antipsychotic treatment in schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2010 Oct 1;34(7):1273-8. Epub 2010 Jul 15.
- Küçükibrahimoğlu E, Saygin MZ, Çalışkan M, Kaplan OK, Unsal C, Gören MZ: The change in plasma GABA, glutamine and glutamate levels in fluoxetine- or S-citalopram-treated female patients with major depression. *Eur J Clin Pharmacol.* 2009 Jun;65(6):571-7.

- Vaiva G, Boss V, Ducrocq F, Fontaine M, Devos P, Brunet A, Laffargue P, Goudemand M, Thomas P: Relationship between posttrauma GABA plasma levels and PTSD at 1-year follow-up. Am J Psychiatry. 2006 Aug;163(8):1446-8.

13. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- Test components contain organic solvents. Contact with skin or mucous membranes must be avoided.
- All reagents in the test package are for research use only.
- Reagents should not be used after the date of expiry stated on the label.
- Single components with different lot numbers should not be mixed or exchanged.
- Guidelines for medical laboratories should be observed.
- Incubation time, incubation temperature, and pipetting volumes of the components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which is not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage resulting from wrong use.

Used symbols:



Temperature limitation



Catalogue Number



For research use only



Contains sufficient for <n> tests



Manufacturer



Use by



Lot number