



ImmSmol

Small molecule antibodies for research, diagnostics & therapy

ImmSmol SAS
PTIB - Hôpital Xavier Arnoz
Avenue Haut Lévêque
33400 Talence - France
+33 547 30 27 72
contact@immusmol.com
www.immusmol.com

Instructions for use **GABA ELISA**

REF

BA E-2500



96

RUO

For research
use only –
Not for use
in diagnostic
procedures

1. Introduction

1.1 Intended use and principle of the test

Enzyme Immunoassay for the quantitative determination of Gamma-aminobutyric acid (GABA) in human plasma, serum, urine and various biological samples.

After extraction and derivatization Gamma-aminobutyric acid (GABA) is quantitatively determined by ELISA. The competitive ELISA uses the microtiter plate format. The antigen is bound to the solid phase of the microtiter plate. The derivatized analyte concentrations of the standards, controls and samples and the solid phase bound analyte compete for a fixed number of antiserum binding sites. When the system is in equilibrium, free antigen and free antigen-antibody complexes are removed by washing. The antibody bound to the solid phase is detected by an anti-rabbit IgG-peroxidase conjugate using TMB as a substrate. The reaction is monitored at 450 nm.

Quantification of unknown samples is achieved by comparing their absorbance with a standard curve prepared with known standards.

2. Procedural cautions, guidelines, warnings and limitations

2.1 Procedural cautions, guidelines and warnings

- (1) This kit is intended for professional use only. Users should have a thorough understanding of this protocol for the successful use of this kit. Only the test instruction provided with the kit is valid and has to be used to run the assay. Reliable performance will only be attained by strict and careful adherence to the instructions provided.
- (2) This assay was validated for a certain type of sample as indicated in *Intended Use* (please refer to Chapter 1). Any off-label use of this kit is in the responsibility of the user and the manufacturer cannot be held liable.
- (3) The principles of Good Laboratory Practice (GLP) have to be followed.
- (4) In order to reduce exposure to potentially harmful substances, wear lab coats, disposable protective gloves and protective glasses where necessary.
- (5) All kit reagents and specimens should be brought to room temperature and mixed gently but thoroughly before use. Avoid repeated freezing and thawing of reagents and specimens.
- (6) For dilution or reconstitution purposes, use deionized, distilled, or ultra-pure water.
- (7) The microplate contains snap-off strips. Unused wells must be stored at 2 °C to 8 °C in the sealed foil pouch with desiccant and used in the frame provided.
- (8) Duplicate determination of sample is highly recommended to be able to identify potential pipetting errors.
- (9) Once the test has been started, all steps should be completed without interruption. Make sure that the required reagents, materials and devices are prepared ready at the appropriate time.
- (10) Incubation times do influence the results. All wells should be handled in the same order and time intervals.
- (11) To avoid cross-contamination of reagents, use new disposable pipette tips for dispensing each reagent, sample, standard and control.
- (12) A standard curve must be established for each run.
- (13) The controls should be included in each run and fall within established confidence limits. The confidence limits are listed in the QC-Report provided with the kit.
- (14) Do not mix kit components with different lot numbers within a test and do not use reagents beyond expiry date as shown on the kit labels.
- (15) Avoid contact with Stop Solution containing 0.25 M H₂SO₄. It may cause skin irritation and burns. In case of contact with eyes or skin, rinse off immediately with water.
- (16) TMB substrate has an irritant effect on skin and mucosa. In case of possible contact, wash eyes with an abundant volume of water and skin with soap and abundant water. Wash contaminated objects before reusing them.
- (17) For information on hazardous substances included in the kit please refer to Safety Data Sheet (SDS). The Safety Data Sheet for this product is made available directly on the website of the manufacturer or upon request.
- (18) Kit reagents must be regarded as hazardous waste and disposed of according to national regulations.

2.2 Limitations

Any inappropriate handling of samples or modification of this test might influence the results.

2.2.1 Interfering substances

Serum/Plasma

Samples containing precipitates or fibrin strands or which are haemolytic or lipemic might cause inaccurate results.

24-hour urine

Please note the sample preparation! If the percentage of the final concentration of acid is too high, this will lead to incorrect results for the urine samples.

2.2.2 Drug interferences

There are no known substances (drugs) which ingestion interferes with the measurement of GABA level in the sample.

2.2.3 High-Dose-Hook effect

No hook effect was observed in this test.

3. Storage and stability

Store the unopened reagents at 2 - 8 °C until expiration date. Do not use components beyond the expiry date indicated on the kit labels. Once opened the reagents are stable for 1 month when stored at 2 - 8 °C. Once the resealable pouch has been opened, care should be taken to close it tightly with desiccant again.

4. Materials

4.1 Contents of the kit

BA D-0090	FOILS	Adhesive Foil - Ready to use
Contents:	Adhesive Foils in a resealable pouch	
Volume:	3 x 4 foils	
BA D-0033	48	Macrotiter Plate - Ready to use
Contents:	2 x 48 well plate, empty in a resealable pouch	
BA E-2442	EXTRACT-PLATE 48	Extraction Plate - Ready to use
Contents:	2 x 48 well plate, precoated with cation exchanger in a resealable pouch	
BA E-0030	WASH-CONC 50x	Wash Buffer Concentrate - Concentrated 50x
Contents:	Buffer with a non-ionic detergent and physiological pH	
Volume:	1 x 20 ml/vial, light purple cap	
BA E-0040	CONJUGATE	Enzyme Conjugate - Ready to use
Contents:	Goat anti-rabbit immunoglobulins conjugated with peroxidase	
Volume:	1 x 12 ml/vial, red cap	
BA E-0055	SUBSTRATE	Substrate - Ready to use
Contents:	Chromogenic substrate containing tetramethylbenzidine, substrate buffer and hydrogen peroxide	
Volume:	1 x 12 ml/black vial, black cap	
BA E-0080	STOP-SOLN	Stop Solution - Ready to use
Contents:	0.25 M sulfuric acid	
Volume:	1 x 12 ml/vial, light grey cap	
Hazards identification:		
	H290 May be corrosive to metals. H314 Causes severe skin burns and eye damage.	
BA E-2531	GABA	GABA Microtiter Strips - Ready to use
Contents:	1 x 96 well (12x8) antigen precoated microwell plate in a resealable foil pouch with desiccant	

BA E-2510 AS GABA **GABA Antiserum** - Ready to use

Contents: Rabbit anti- GABA antibody, blue coloured

Volume: 1 x 6 ml/vial, blue cap

Standards and Controls - Ready to use

Cat. no.	Component	Colour/Cap	Concentration ng/ml	Concentration nmol/l	Volume/Vial
BA E-2501	<u>STANDARD</u> A	white	0	0	4 ml
BA E-2502	<u>STANDARD</u> B	light yellow	75	727	4 ml
BA E-2503	<u>STANDARD</u> C	orange	250	2 425	4 ml
BA E-2504	<u>STANDARD</u> D	dark blue	750	7 275	4 ml
BA E-2505	<u>STANDARD</u> E	light grey	2 500	24 250	4 ml
BA E-2506	<u>STANDARD</u> F	black	7 500	72 750	4 ml
BA E-2551	<u>CONTROL</u> 1	light green	Refer to QC-Report for expected value and acceptable range!		4 ml
BA E-2552	<u>CONTROL</u> 2	dark red			4 ml

Conversion: GABA (ng/ml) x 9.7 = GABA (nmol/l)

Contents: Acidic buffer with non-mercury preservative, spiked with defined quantity of GABA

BA E-2513 ASSAY-BUFF **Assay Buffer** - Ready to use

Contents: Buffer with non-mercury preservative

Volume: 1 x 20 ml/vial, yellow cap

BA E-2428 EQUA-REAG **Equalizing Reagent** - Lyophilized

Contents: Lyophilized protein

Volume: 1 vial, brown cap

BA E-2446 D-REAGENT **D-Reagent** - Ready to use

Contents: Crosslinking agent in dimethylsulfoxide

Volume: 1 x 4 ml/vial, white cap

BA E-2458 Q-BUFFER **Q-Buffer** - Ready to use

Contents: TRIS buffer

Volume: 1 x 20 ml/vial, white cap

BA E-2561 I-BUFFER **I-Buffer** - concentrated

Contents: Buffer with non-ionic detergent and non-mercury preservative

Volume: 1 x 4 ml/vial, light red cap

BA E-2541 ELUTION-BUFF **Elution-Buffer** - Ready to use

Contents: Buffer with citric acid

Volume: 1 x 50 ml/vial, dark green cap

BA E-2560 DILUENT **Diluent** - Ready to use

Contents: Buffer with acidic pH

Volume: 2 x 20 ml/vial, blue cap

BA E-2787 NAOH **NaOH** - Ready to use

Contents: Sodium hydroxide solution

Volume: 1 x 2 ml/vial, purple cap

Hazards identification:



H290 May be corrosive to metals.
 H315 Causes skin irritation.
 H319 Causes serious eye irritation.

*For the determination of serum and plasma, standards and controls should always be diluted 1:3 [e.g. 100 µl standard + 200 µl water (deionized, distilled, or ultra-pure)]. Do not forget to correct the result afterwards for the dilution. Urine values of GABA are higher than for serum and plasma. Dilution of the standards is to make sure sample is measured in linear part of standard curve.

4.2 Additional materials and equipment required but not provided in the kit

- Calibrated precision pipettes to dispense volumes between 10 – 400 µl; 1 ml; 10 ml
- Microtiter plate washing device (manual, semi-automated or automated)
- ELISA reader capable of reading absorbance at 450 nm and if possible 620 - 650 nm
- Microtiter plate shaker (shaking amplitude 3 mm; approx. 600 rpm)
- Vortex mixer
- Absorbent material (paper towel)
- Water (deionized, distilled, or ultra-pure)

5. Sample collection and storage

Plasma

Whole blood should be collected into centrifuge tubes containing EDTA as anti-coagulant (Monovette™ or Vacuette™ for plasma) and centrifuged according to manufacturer's instructions at room temperature immediately after collection.

Fasting specimens or pre-feed specimens for children (2 - 3 hours after last meal) are advised.

Haemolytic and especially lipemic samples should not be used for the assay.

Storage: up to 24 hours at 2 - 8 °C, for longer period (up to 6 month) at -20 °C.

Repeated freezing and thawing should be avoided.

Serum

Collect blood by venipuncture (Monovette™ or Vacuette™ for serum), allow to clot, and separate serum by centrifugation according to manufacturer's instructions at room temperature. Do not centrifuge before complete clotting has occurred. Patients receiving anticoagulant therapy may require increased clotting time. Fasting specimens or pre-feed specimens for children (2 - 3 hours after last meal) are advised.

Haemolytic and especially lipemic samples should not be used for the assay.

Storage: up to 24 hours at 2 - 8 °C, for longer period (up to 6 month) at -20 °C.

Repeated freezing and thawing should be avoided.

Urine

Spontaneous urine or 24-hour urine, collected in a bottle containing 10 - 15 ml of 6 M HCl, can be used.

If 24-hour urine is used please record the total volume of the collected urine.

Storage: for longer periods (up to 6 month) at -20 °C.

Repeated freezing and thawing should be avoided. Avoid exposure to direct sunlight!

6. Test procedure

Allow all reagents and samples to reach room temperature and mix thoroughly by gentle inversion before use. Duplicate determinations are recommended. It is recommended to number the strips of the microwell plate before usage to avoid any mix-up.

The binding of the antisera and of the enzyme conjugate and the activity of the enzyme are temperature dependent, and the absorption values may vary if a thermostat is not used. The higher the temperature, the higher the absorption values will be. Varying incubation times will have similar influences on the absorbance. The optimal temperature during the Enzyme Immunoassay is between 20 – 25 °C.

In case of overflow, read the absorbance of the solution in the wells within 10 minutes, using a microplate reader set to 405 nm

6.1 Preparation of reagents

Wash Buffer

Dilute the 20 ml Wash Buffer Concentrate with water (deionized, distilled, or ultra-pure) to a final volume of 1000 ml.

Storage: 1 month at 2 – 8 °C

Equalizing Reagent

Reconstitute the Equalizing Reagent with **10 ml** of **Assay Buffer**.

Reconstituted Equalizing Reagent which is not used immediately has to be stored in aliquots for max 1 month at -20 °C and may be thawed only once.

I-Buffer

Dilute the 4 ml I-Buffer Concentrate with water (deionized, distilled, or ultra-pure) to a final volume of 400 ml.

Storage: 1 month at 2 – 8 °C

D-Reagent

The D-Reagent has a freezing point of 18.5 °C. Make sure that the D-Reagent has reached room temperature and forms a homogeneous, crystal-free solution.

GABA Microtiter Strips

In rare cases residues of the blocking and stabilizing reagent can be seen in the wells as small, white dots or lines. These residues do not influence the quality of the product.

6.2 Preparation of samples

The GABA ELISA is a flexible test system for various biological sample types and samples. It is not possible to give a general advice how to prepare the samples. However, the following basics should help the researcher to fit the protocol to his specific needs:

▲ For the determination of samples in a **range between 25 – 2500 ng/ml**, standards and controls should always be **diluted 1:3** with water [e.g. 100 µl standard + 200 µl water (deionized, distilled, or ultra-pure)]. This predilution of the standards has to be taken into account in the calculation of results.

The standards are diluted to make sure that the samples fall into the linear part of the standard curve. **Do not dilute samples!**

▲ For the determination of samples in a **range between 75 – 7 500 ng/ml**, **do not dilute standards, controls or samples.**

- Avoid excess of acid: excess of acid might exceed the buffer capacity of the dilution buffer. A pH of 3.0 during the extraction is mandatory.
- It is advisable to perform a **Proof of Principle** to determine the recovery of GABA from the samples. Prepare a stock solution of GABA. Add small amounts (to change the native sample matrix as less as possible) of the stock solutions to the sample matrix and check the recovery.
- The sample volume determines the sensitivity of this test. Determine the sample volume needed to determine GABA in your sample by testing different amounts of sample volumes.

If you need any support in establishing a protocol for your specific purposes, do not hesitate to contact the manufacturer directly!

6.3 Test procedure (75 – 7 500 ng/ml)

6.3.1 Extraction

1.	Pipette 100 µl of the standards, controls and samples into the appropriate wells of the Extraction Plate .
2.	Add 100 µl of the Diluent to all wells. Cover plate with Adhesive Foil and incubate for 15 min at RT (20 – 25 °C) on a shaker (approx. 600 rpm).
3.	Discard and blot dry by tapping the inverted plate on absorbent material. Wash each well with 500 µl of water (deionized, distilled, or ultra-pure) and incubate for 5 min at RT (20 – 25 °C) on a shaker (approx. 600 rpm).
4.	Discard the wash and blot dry by tapping the inverted plate on absorbent material.
5.	Pipette 400 µl of Elution Buffer into the appropriate wells of the Extraction Plate . Cover plate with Adhesive Foil and incubate for 10 min at RT (20 – 25 °C) on a shaker (approx. 600 rpm).
6.	Use 100 µl for the subsequent derivatization!

6.3.2 Derivatization

1.	Pipette 100 µl of the extracted standards, controls and samples into the appropriate wells of the Microtiter Plate .
2.	Pipette 10 µl of the NaOH into all wells.
3.	Add 50 µl of the Equalizing Reagent (fresh prepared before assay) to all wells and incubate for 1 min on a shaker (approx. 600 rpm).
4.	Pipette 10 µl of the D-Reagent into all wells.
5.	Cover plate with Adhesive Foil and incubate for 2 h at RT (20 – 25 °C) on a shaker (approx. 600 rpm).
6.	Pipette 200 µl Q-Buffer into all wells.
7.	Shake for 10 min at RT (20 – 25 °C) on a shaker (approx. 600 rpm).
8.	Use 50 µl for the subsequent ELISA!

6.3.3 GABA ELISA

1.	Pipette 50 µl of the derivatized standards, controls and samples into the appropriate wells of the GABA Microtiter Strips .
2.	Pipette 50 µl of the GABA Antiserum into all wells and mix shortly.
3.	Cover plate with Adhesive Foil and incubate for 15 - 20 h (overnight) at 2 - 8 °C . <i>Alternatively incubate 2 h at RT (20 - 25 °C) on a shaker (approx. 600 rpm).</i>
4.	Remove the foil. Discard or aspirate the content of the wells. Wash the plate 3 x by adding 300 µl of Wash Buffer , discarding the content and blotting dry each time by tapping the inverted plate on absorbent material.
5.	Pipette 100 µl of the Enzyme Conjugate into all wells.
6.	Incubate for 30 min at RT (20 - 25 °C) on a shaker (approx. 600 rpm).
7.	Discard or aspirate the content of the wells. Wash the plate 3 x by adding 300 µl of Wash Buffer , discarding the content and blotting dry each time by tapping the inverted plate on absorbent material.
8.	Pipette 100 µl of the Substrate into all wells and incubate for 20 - 30 min at RT (20 - 25 °C) on a shaker (approx. 600 rpm). Avoid exposure to direct sunlight!
9.	Add 100 µl of the Stop Solution to each well and shake the microtiter plate to ensure a homogeneous distribution of the solution.
10.	Read the absorbance of the solution in the wells within 10 minutes, using a microplate reader set to 450 nm (if available a reference wavelength between 620 nm and 650 nm is recommended).

6.4 Test procedure (25 - 2 500 ng/ml)

6.4.1 Extraction

1.	Pipette 300 µl of the diluted standards, controls and undiluted samples into the appropriate wells of the Extraction Plate .
2.	Add 300 µl of the Diluent to all wells. Cover plate with Adhesive Foil and incubate for 30 min at RT (20 - 25 °C) on a shaker (approx. 600 rpm).
3.	Washing step (2 cycles): Discard and blot dry by tapping the inverted plate on absorbent material. Add 1ml of I-Buffer to each well and incubate the plate for 5 min at RT (20 - 25 °C) on a shaker (approx. 600 rpm). Discard and blot dry by tapping the inverted plate on absorbent material. Add 1ml of I-Buffer to each well and incubate the plate for 5 min at RT (20 - 25 °C) on a shaker (approx. 600 rpm).
4.	Discard and blot dry by tapping the inverted plate on absorbent material.
5.	Pipette 250 µl of Elution Buffer into the appropriate wells of the Extraction Plate . Cover plate with Adhesive Foil and incubate for 10 min at RT (20 - 25 °C) on a shaker (approx. 600 rpm).
6.	Use 100 µl for the subsequent derivatization!

6.4.2 Derivatization

1.	Pipette 100 µl of the extracted standards, controls and samples into the appropriate wells of the MacroTiter Plate .
2.	Pipette 10 µl of the NaOH into all wells.
3.	Add 50 µl of the Equalizing Reagent (fresh prepared before assay) to all wells and incubate for 1 min on a shaker (600 rpm).
4.	Pipette 10 µl of the D-Reagent into all wells.
5.	Cover plate with Adhesive Foil and incubate for 2 h at RT (20 - 25 °C) on a shaker (approx. 600 rpm).
6.	Pipette 150 µl Q-Buffer into all wells.
7.	Incubate for 10 min at RT (20 - 25 °C) on a shaker (approx. 600 rpm).
8.	Use 25 µl for the subsequent ELISA!

6.4.3 GABA ELISA

1.	Pipette 25 µl of the derivatized standards, controls and samples into the appropriate wells of the GABA Microtiter Strips .
2.	Pipette 50 µl of the GABA Antiserum into all wells and mix shortly.
3.	Cover plate with Adhesive Foil and incubate for 15 - 20 h (overnight) at 2 - 8 °C . Alternatively incubate 2 h at RT (20 - 25 °C) on a shaker (approx. 600 rpm).
4.	Remove the foil. Discard or aspirate the content of the wells. Wash the plate 3 x by adding 300 µl of Wash Buffer, discarding the content and blotting dry each time by tapping the inverted plate on absorbent material.
5.	Pipette 100 µl of the Enzyme Conjugate into all wells.
6.	Cover plate with Adhesive Foil . Incubate for 30 min at RT (20 - 25 °C) on a shaker (approx. 600 rpm).
7.	Remove the foil. Discard or aspirate the content of the wells. Wash the plate 3 x by adding 300 µl of Wash Buffer, discarding the content and blotting dry each time by tapping the inverted plate on absorbent material.
8.	Pipette 100 µl of the Substrate into all wells and incubate for 20 - 30 min at RT (20 - 25 °C) on a shaker (approx. 600 rpm). Avoid exposure to direct sunlight!
9.	Add 100 µl of the Stop Solution to each well and shake the microtiter plate to ensure a homogeneous distribution of the solution.
10.	Read the absorbance of the solution in the wells within 10 minutes, using a microplate reader set to 450 nm (if available a reference wavelength between 620 nm and 650 nm is recommended).

7. Calculation of results

Measuring range	GABA	
	Urine	49 - 7 500 ng/ml
Plasma/Serum	25 - 2 500 ng/ml	

The standard curve is obtained by plotting the absorbance readings (calculate the mean absorbance) of the standards (linear, y-axis) against the corresponding standard concentrations (logarithmic, x-axis). Use non-linear regression for curve fitting (e.g. spline, 4- parameter, akima).

This assay is a competitive assay. This means: the OD-values are decreasing with increasing concentrations of the analyte. OD-values found below the standard curve correspond to high concentrations of the analyte in the sample and have to be reported as being positive.

Serum/plasma

The read concentrations of **plasma samples** have to be **divided by 3**.

Urine samples and controls

The concentrations of the samples and controls can be read directly from the standard curve.

The total amount of GABA excreted in urine during 24 h is calculated as following:

$$\mu\text{g}/24\text{h} = \mu\text{g}/\text{l} \times \text{l}/24\text{h}$$

Conversion

$$\text{GABA (ng/ml)} \times 9.7 = \text{GABA (nmol/l)}$$

Expected reference value

It is strongly recommended that each laboratory should determine its own reference value.

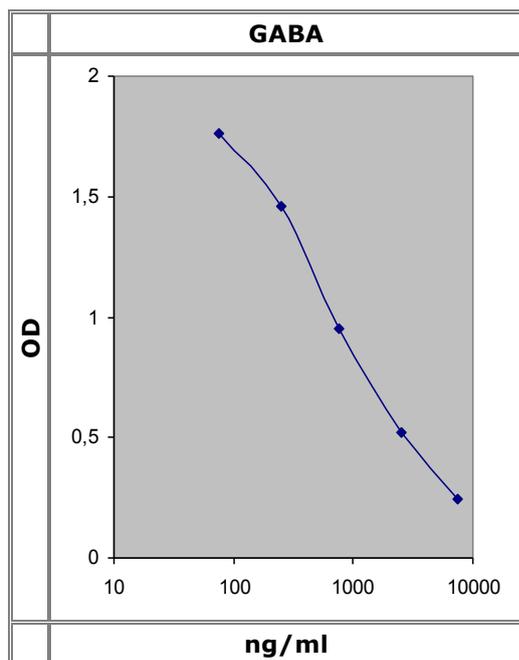
Expected Reference Value	Spontaneous urine	230 - 1 290 µg/g creatinine
--------------------------	-------------------	-----------------------------

7.1 Quality control

The confidence limits of the kit controls are indicated on the QC-Report.

7.2 Typical standard curve

▲ Example, do not use for calculation!



8. Assay characteristics

Sensitivity (lower limit of detection)	Urine (spontaneous)
	49 ng/ml

Recovery	Mean (%)	Range (%)	% Recovery after spiking
	104%	96 - 116%	

Linearity	Range (ng/ml)	Range (%)	Mean (%)
	35 - 4048	74-119	93

Analytical Specificity (Cross Reactivity)	Substance	Cross Reactivity (%)
		GABA
	GABA	100
	β-Alanine	1.6
	α-Aminobutyric acid	< 0.09
	Glycine	< 0.09
	L-Glutamine	< 0.09
	β-Aminobutyric acid	< 0.09

Precision					
Intra-Assay			Inter-Assay		
Sample	Range (ng/ml)	CV (%)	Sample	Range (ng/ml)	CV (%)
1	318 ± 32	10	1	279 ± 35	12
2	723 ± 94	13	2	661 ± 73	11
3	2457 ± 110	4.9	3	1492 ± 117	7.8

9. References/Literature

- (1) Shmais et al. Mechanism of nitrogen metabolism-related parameters and enzyme activities in the pathophysiology of autism. *Journal of Neurodevelopmental Disorders* 4(1):4 (2012)
- (2) El-Ansary et al. Relationship between chronic lead toxicity and plasma neurotransmitters in autistic patients from Saudi Arabia. *Clinical Biochemistry*, 44(23):1116-1120 (2011)
- (3) Lee et al. Astrocytes Are GABAergic Cells That Modulate Microglial Activity. *Glia* 59:152-165 (2011)

■ **For updated literature or any other information please contact your local supplier.**

■ **The liability of the manufacturer shall be limited to the replacement of defective products. The manufacturer takes no liability for any damages or expenses arising directly or indirectly from the use of this product.**

Symbols:

	Storage temperature		Manufacturer		Contains sufficient for <n> tests
	Expiry date		Batch code		For in-vitro diagnostic use only!
	Consult instructions for use		Content		CE labelled
	Caution		Catalogue number		For research use only!

1. Einleitung

1.1 Verwendungszweck und Testprinzip

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Gamma-Aminobuttersäure (GABA) in humanem Plasma, Serum, Urin und verschiedenen biologischen Proben.

Gamma-Aminobuttersäure (GABA) wird extrahiert und derivatisiert und anschließend quantitativ im ELISA bestimmt.

Der sich anschließende kompetitive ELISA basiert auf dem Mikrotiterplattenformat. Das Antigen ist an eine feste Phase gebunden. Die Analytkonzentrationen der Standards, Kontrollen und Proben und die an der festen Phase gebundenen Analytkonzentrationen, konkurrieren um die vorhandenen Bindungsstellen der Antikörper. Wenn das System im Gleichgewicht ist, werden die freien Antigene und die freien Antigen-Antikörper-Komplexe durch Waschen entfernt. Der an der festen Phase gebundene Antigen-Antikörper-Komplex wird mit einem enzymmarkierten Antikörper bestimmt und mit einem Substrat durch eine Farbreaktion nachgewiesen. Die Reaktion wird bei 450 nm gemessen.

Die Konzentrationen in den Proben werden mit Hilfe einer Standardkurve ermittelt.

2. Verfahrenshinweise, Richtlinien, Warnungen und Anwendungsgrenzen

2.1 Verfahrenshinweise, Richtlinien und Warnungen

- (1) Dieses Kit ist nur für den gewerblichen Gebrauch bestimmt. Für eine erfolgreiche Anwendung dieses Kits benötigen die Anwender ein umfassendes Verständnis dieses Protokolls. Einzig die im Kit enthaltene Testanleitung ist gültig und bei der Durchführung des Assays zu verwenden. Für eine zuverlässige Leistung müssen die mitgelieferten Anweisungen genau und sorgfältig befolgt werden.
- (2) Dieser Assay wurde für die unter *Verwendungszweck* (siehe Kapitel 1) angegebene Probenart validiert. Jede nicht zugelassene Anwendung dieses Kits obliegt der Verantwortung des Anwenders und entbindet den Hersteller von jeglicher Haftung.
- (3) Die Grundsätze der Guten Laborpraxis (GLP) sind zu befolgen.
- (4) Bei Bedarf Laborkittel, geeignete Einweghandschuhe und Schutzbrille tragen, um die Exposition gegenüber potenziell gesundheitsgefährdenden Stoffen zu reduzieren.
- (5) Alle Reagenzien des Kits sowie die Proben sollten vor der Verwendung auf Raumtemperatur gebracht und vorsichtig aber gründlich gemischt werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen von Reagenzien und Proben vermeiden.
- (6) Wenn die Verdünnung oder Rekonstitution mit Wasser erfolgen soll, hierfür deionisiertes, destilliertes oder ultra-pures Wasser verwenden.
- (7) Die Mikrotiterplatte verfügt über abbrechbare Streifen. Ungenutzte Kavitäten müssen bei 2 °C bis 8 °C mit Trockenmittelbeutel im verschlossenen Folienbeutel gelagert und im mitgelieferten Rahmen verwendet werden.
- (8) Es ist sehr empfehlenswert, eine Doppelbestimmung der Proben durchzuführen, um mögliche Pipettierfehler erkennen zu können.
- (9) Sobald der Test begonnen wurde, sollten alle Schritte ohne Unterbrechung ausgeführt werden. Es muss dafür gesorgt werden, dass die erforderlichen Reagenzien, Materialien und Geräte zur vorgesehenen Zeit einsatzbereit sind.
- (10) Die Inkubationszeiten haben Einfluss auf die Ergebnisse. Alle Kavitäten sollten in der gleichen Reihenfolge und zeitlichen Abfolge behandelt werden.
- (11) Zur Vermeidung einer Kontamination der Reagenzien ist bei jeder Abgabe eines Reagenzes, einer Probe, eines Standards und einer Kontrolle eine neue Einwegpipettenspitze zu verwenden.
- (12) Bei jeder Testanwendung muss eine Standardkurve erstellt werden.
- (13) Bei jeder Testanwendung sollten Kontrollen mitgetestet werden, deren Werte innerhalb der bekannten Vertrauensgrenzen liegen müssen. Die gültigen Vertrauensgrenzen der Kitkontrollen können dem QC-Report entnommen werden, der dem Kit beiliegt.
- (14) Komponenten von Kits mit unterschiedlichen Chargenbezeichnungen nicht im selben Test verwenden. Reagenzien nach dem auf dem Kitetikett angegebenen Verfalldatum nicht mehr benutzen.
- (15) Kontakt mit der Stopplösung vermeiden, da sie 0,25 M H₂SO₄ enthält. Die Lösung kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen. Bei Berührung mit den Augen oder der Haut sofort mit Wasser aus- bzw. abspülen.
- (16) Das TMB-Substrat reizt die Haut und Schleimhäute. Bei möglichem Kontakt Augen mit reichlich Wasser und Haut mit Seife und reichlich Wasser aus- bzw. abspülen. Kontaminierte Gegenstände vor der erneuten Verwendung abspülen.
- (17) Für Informationen zu den im Kit enthaltenen gesundheitsgefährdenden Stoffen siehe die Sicherheitsdatenblatt (SDS). Das Sicherheitsdatenblatt dieses Produkts ist direkt auf der Webseite des Herstellers abrufbar oder auf Anfrage erhältlich.
- (18) Die Reagenzien des Kits sind als gesundheitsgefährdende Abfälle zu betrachten und gemäß den nationalen Vorschriften zu entsorgen.

2.2 Grenzen des Tests

Jede unsachgemäße Behandlung der Proben oder Modifikationen dieses Tests können die Ergebnisse beeinflussen.

2.2.1 Interferenzen

Serum/Plasma

Proben, die ein Präzipitat oder die Fibrinfäden enthalten oder die hämolytisch oder lipämisch sind, können zu ungenauen Ergebnissen führen.

Sammelurin

Probenvorbereitung beachten! Ist der Säuregehalt des 24 Stunden-Sammelurins zu hoch, führt dies zu falschen Ergebnissen der Urinproben.

2.2.2 Beeinflussung durch Medikamente

Bislang sind uns keine Stoffe (Medikamente) bekannt, deren Einnahme die Bestimmung des GABA-Gehaltes in der Probe beeinflusst.

2.2.3 High-Dose-Hook Effekt

Ein Hook-Effekt tritt in diesem Test nicht auf.

3. Lagerung und Haltbarkeit

Die ungeöffneten Reagenzien sind bei 2 - 8 °C bis zum Verfallsdatum aufzubewahren. Die Reagenzien dürfen nach Überschreiten des Verfallsdatums nicht mehr verwendet werden. Einmal geöffnet sind die Reagenzien 1 Monat stabil, wenn sie bei 2 - 8 °C gelagert werden. Der einmal geöffnete Folienbeutel sollte stets mit Trockenmittelbeutel sehr sorgfältig wieder verschlossen werden.

4. Materialien

4.1 Reagenzien im Kit

BA D-0090	FOILS	Adhesive Foil - Gebrauchsfertig
Inhalt:	4 Klebefolien in einem wiederverschließbaren Beutel	
Volumen:	3 x 4 Folien	
BA D-0033	48	Macrotiter Plate - Gebrauchsfertig
Contents:	2 x 48 Well Platte, leer in einem wiederverschließbaren Beutel	
BA E-2442	EXTRACT-PLATE 48	Extraction Plate - Gebrauchsfertig
Inhalt:	2 x 48 Well Platte, beschichtet mit Kationenaustauscher in einem wiederverschließbaren Beutel	
BA E-0030	WASH-CONC 50x	Wash Buffer Concentrate - 50x konzentriert
Inhalt:	Puffer mit einem nicht-ionischen Detergenz und physiologischem pH	
Volumen:	1 x 20 ml/Fläschchen, Deckel helllila	
BA E-0040	CONJUGATE	Enzyme Conjugate - Gebrauchsfertig
Inhalt:	Ziege Anti-Kaninchen Immunglobulin konjugiert mit Peroxidase	
Volumen:	1 x 12 ml/ Fläschchen, Deckel rot	
BA E-0055	SUBSTRATE	Substrate - Gebrauchsfertig
Inhalt:	Chromogenes Substrat mit Tetramethylbenzidin, Substratpuffer und Wasserstoffperoxid	
Volumen:	1 x 12 ml/ Fläschchen schwarz, Deckel schwarz	
BA E-0080	STOP-SOLN	Stop Solution - Gebrauchsfertig
Inhalt:	0,25 M Schwefelsäure	
Volumen:	1 x 12 ml/ Fläschchen, Deckel hellgrau	
Mögliche Gefahren:		

H290 Kann gegenüber Metallen korrosiv sein.

H314 Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden.

BA E-2531 GABA **GABA Microtiter Strips** - Gebrauchsfertig
 Inhalt: 1 x 96 Well (12x8) Antigen beschichtete Mikrotiterstreifen mit Trockenmittelbeutel in einem widerverschließbaren Folienbeutel

BA E-2510 AS GABA **GABA Antiserum** - Gebrauchsfertig
 Inhalt: Kaninchen Anti- GABA Antikörper, blau gefärbt
 Volumen: 1 x 6 ml/Fläschchen, Deckel blau

Standards und Controls - Gebrauchsfertig

ArtikelNr.	Komponente	Deckelfarbe	Konzentration ng/ml	Konzentration nmol/l	Volumen/ Fläschchen
BA E-2501	STANDARD A	weiß	0	0	4 ml
BA E-2502	STANDARD B	hellgelb	75	727	4 ml
BA E-2503	STANDARD C	orange	250	2425	4 ml
BA E-2504	STANDARD D	dunkelblau	750	7275	4 ml
BA E-2505	STANDARD E	hellgrau	2500	24250	4 ml
BA E-2506	STANDARD F	schwarz	7500	72750	4 ml
BA E-2551	CONTROL 1	hellgrün	Die zu erwartenden Konzentrationen und Akzeptanzbereiche sind auf dem QC-Report angegeben		4 ml
BA E-2552	CONTROL 2	dunkelrot			4 ml

Umrechnung: $GABA (ng/ml) \times 9,7 = GABA (nmol/l)$

Inhalt: Saurer Puffer aufgestockt mit einer definierten Menge GABA

BA E-2513 ASSAY-BUFF **Assay Buffer** - Gebrauchsfertig
 Inhalt: Puffer mit quecksilberfreiem Konservierungsmittel
 Volumen: 1 x 20 ml/Fläschchen, Deckel gelb

BA E-2428 EQUA-REAG **Equalizing Reagent** - Lyophilisiert
 Inhalt: Lyophilisiertes Protein
 Volumen: 1 Fläschchen, Deckel braun

BA E-2446 D-REAGENT **D-Reagent** - Gebrauchsfertig
 Inhalt: Crosslinker in Dimethylsulfoxid
 Volumen: 1 x 4 ml/Fläschchen, Deckel weiß

BA E-2458 Q-BUFFER **Q-Buffer** - Gebrauchsfertig
 Inhalt: TRIS Puffer
 Volumen: 1 x 20 ml/Fläschchen, Deckel weiß

BA E-2561 I-BUFFER **I-Buffer** - Konzentriert
 Inhalt: Puffer mit nicht-ionischem Detergenz und quecksilberfreiem Konservierungsmittel
 Volumen: 1 x 4 ml/Fläschchen, Deckel hellrot

BA E-2541 ELUTION-BUFF **Elution-Buffer** - Gebrauchsfertig
 Inhalt: Puffer mit Zitronensäure
 Volumen: 1 x 50 ml/Fläschchen, Deckel dunkelgrün

BA E-2560 DILUENT **Diluent** - Gebrauchsfertig
 Inhalt: Puffer mit saurem pH
 Volumen: 2 x 20 ml/Fläschchen, Deckel blau

BA E-2787**NAOH****NaOH** - Gebrauchsfertig

Inhalt: Verdünnte Natronlauge

Volumen: 1 x 2 ml/Fläschchen, Deckel lila

Mögliche Gefahren:



H290 Kann gegenüber Metallen korrosiv sein.

H315 Verursacht Hautreizungen.

H319 Verursacht schwere Augenreizung.

*Für die Bestimmung von Plasma und Serum sollten die Standards und Kontrollen immer 1:3 verdünnt werden [z.B. 100 µl Standard + 200 µl Wasser (deionisiert, destilliert oder ultra-pur)]. Die Ergebnisse danach um den Faktor der Verdünnung korrigieren. Die GABA- Urinwerte sind höher als für Serum und Plasma. Die Verdünnung stellt sicher, dass die Probe im linearen Bereich der Standardkurve gemessen wird.

4.2 Nicht im Kit enthaltene aber zur Durchführung erforderliche Geräte und Reagenzien

- Kalibrierte Präzisionspipetten zum Pipettieren von 10 – 400 µl; 1 ml; 10 ml
- Waschvorrichtung für Mikrotiterplatten (manuell, halbautomatisch oder automatisch)
- Photometer zur Auswertung von Mikrotiterplatten mit 450 nm- und, wenn möglich, 620 - 650 nm-Filter
- Mikrotiterplattenschüttler (ca. 600 rpm mit Amplitude 3 mm)
- Vortex-Mischer
- Wasser (deionisiert, destilliert oder ultra-pur)
- saugfähige Unterlage

5. Probenmaterial und Lagerung**Plasma**

Das durch Venenpunktion entnommene Vollblut in einem für EDTA-Plasma vorgesehenen Blutentnahmeröhrchen (Plasma Monovette™ oder Vacuette®) sammeln und das Plasma direkt durch Zentrifugation (nach Angaben des Herstellers) von den übrigen Blutbestandteilen trennen.

Es wird dazu geraten, Blutproben im nüchternen Zustand - bei Kindern 2 -3 Stunden nach der letzten Mahlzeit - zu verwenden. Hämolytische und insbesondere lipämische Proben sollten nicht verwendet werden.

Lagerung: bis zu 24 Stunden bei 2 - 8 °C, für längere Zeit (bis zu 6 Monate) bei -20 °C

Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden.

Serum

Blut durch Venenpunktion entnehmen (Serum Monovette™ oder Vacuette®), gerinnen lassen und das Serum durch Zentrifugation (nach Angaben des Herstellers) abtrennen. Vor der Zentrifugation muss die Gerinnung vollständig abgeschlossen sein. Bei Patienten, die Antikoagulantien erhalten, kann die Gerinnungszeit länger dauern.

Es wird dazu geraten, Blutproben im nüchternen Zustand - bei Kindern 2 -3 Stunden nach der letzten Mahlzeit - zu verwenden. Hämolytische und insbesondere lipämische Proben sollten nicht eingesetzt werden.

Lagerung: bis zu 24 Stunden bei 2 - 8 °C, für längere Zeit (bis zu 6 Monate) bei -20 °C

Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden.

Urin

Es kann Spontanurin oder 24 Stunden-Sammelurin verwendet werden (im Sammelbehälter werden zur Stabilisierung des Sammelurins 10 - 15 ml 6 M HCl vorgelegt). Wird 24 Stunden-Sammelurin verwendet, ist es notwendig, das Volumen zu bestimmen und für die spätere Auswertung der Ergebnisse zu notieren.

Lagerung: für längere Zeit (bis zu 6 Monate) bei -20 °C.

Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden.

Direktes Sonnenlicht vermeiden!

6. Testdurchführung

Vor dem Gebrauch müssen alle Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht und vorsichtig durchmischt werden. Die Durchführung von Doppelbestimmungen wird empfohlen. Um eventuelle Verwechslungen der Mikrotiterstreifen zu vermeiden, wird empfohlen, diese vor Verwendung zu nummerieren.

Die Reaktion des Antiserums, Enzymkonjugats und die Aktivität des Enzyms sind temperaturabhängig. Die optimale Temperatur während des Enzymimmunoassay ist zwischen 20 – 25°C. Es wird empfohlen, dies mit einem Thermometer zu überprüfen.

Liegt die gemessene Absorption außerhalb des Messbereichs, so muss diese innerhalb von 10 Minuten nochmals bei 405 nm gemessen werden.

6.1 Vorbereitung der Reagenzien

Waschpuffer

20 ml **WASH-CONC 50X** mit Wasser (deionisiert, destilliert oder ultra-pur) auf ein Endvolumen von 1000 ml verdünnen.

Lagerung: 1 Monat bei 2 – 8 °C

Ausgleichsreagenz

Den Inhalt eines Fläschchen **EQUA-REAG** (BA E-2428) mit **10 ml ASSAY-BUFF** (BA E-2513) lösen. Rekonstituiertes Ausgleichsreagenz, welches nicht benötigt wird, sollte umgehend in Aliquots für max. 1 Monat bei -20 °C gelagert werden (nur einmal auftauen).

I-Puffer

4 ml **I-BUFFER** mit Wasser (deionisiert, destilliert oder ultra-pur) auf ein Endvolumen von 400 ml verdünnen.

Lagerung: 1 Monat bei 2 – 8 °C

D-Reagent **D-REAGENT**

Das **D-REAGENT** hat einen Gefrierpunkt von 18,5 °C. Es muss sichergestellt sein, dass es vor der Verwendung Raumtemperatur angenommen hat und eine homogene, kristallfreie Lösung bildet.

GABA Microtiter Strips

Vereinzelt können Rückstände der Blockier- und Stabilisierlösung in den Wells zu sehen sein (kleine weiße Punkte oder Linien). Diese stellen keine Beeinträchtigung der Qualität des Produktes dar

6.2 Probenvorbereitung

Der GABA ELISA ist ein flexibles Testsystem für verschiedene biologische Probenarten und Volumina. Es ist nicht möglich, eine pauschale Empfehlung zur Probenvorbereitung zu geben. Allerdings können die folgenden Grundlagen dazu beitragen, das Protokoll an die spezifischen Anforderungen anzupassen:

■ Für die Bestimmung von Proben in einem **Bereich zwischen 25 – 2500 ng/ml**, sollten die Standards und Kontrollen immer **1:3 mit Wasser verdünnt** werden [z.B. 100 µl Standard + 200 µl Wasser (deionisiert, destilliert oder ultra-pur)]. Diese Vorverdünnung der Standards muss bei der Berechnung der Ergebnisse berücksichtigt werden.

Die Standards werden vorverdünnt, um sicherzustellen, dass die Proben im linearen Bereich der Kurve gefunden werden.

Keinesfalls die Proben verdünnen!

■ Für die Bestimmung von Proben in einem **Bereich zwischen 75 – 7 500 ng/ml**, **keinesfalls Standards, Kontrollen oder Proben verdünnen.**

- Säureüberschuss vermeiden: Ein Säureüberschuss könnte die Pufferleistung des Verdünnungspuffers überschreiten. Ein **pH 3,0** während der Extraktion ist zwingend notwendig.
- Es ist ratsam, ein **Proof of Principle** zu erstellen, um die Wiederfindung von GABA in den Proben bestimmen zu können. Dazu eine GABA-Stocklösung herstellen. Von der hergestellten Stocklösung kleine Mengen (um die native Probenmatrix so wenig, wie möglich zu ändern) zur Probenmatrix hinzugeben und die Wiederfindung prüfen.
- Die Probenvolumina bestimmen die Sensitivität des Tests. Zur Bestimmung von GABA in der Probe, muss vorher das Probenvolumen durch Austestung verschiedener Mengen an Probenvolumina bestimmt werden.

Falls Sie Unterstützung bei der Erstellung eines Protokolls für Ihre spezifischen Zwecke benötigen, wenden Sie sich vertrauensvoll direkt an den Hersteller!

6.3 Testdurchführung (75 – 7 500 ng/ml)

6.3.1 Extraktion

1.	Jeweils 100 µl der Standards, Kontrollen und Proben in die entsprechenden Kavitäten der EXTRACT-PLATE 48 pipettieren.
2.	Jeweils 100 µl DILUENT in alle Kavitäten pipettieren. Platte mit FOIL abdecken und 15 Min bei RT (20 – 25 °C) auf einem Schüttler (ca. 600 rpm) inkubieren.
3.	Den Inhalt der Kavitäten ausleeren und die Restflüssigkeit durch Ausklopfen auf einer saugfähigen Unterlage entfernen. Jede Kavität mit 500 µl Wasser (deionisiert, destilliert oder ultra-pur) waschen und für 5 Min bei RT (20 – 25 °C) auf einem Schüttler (ca. 600 rpm) inkubieren.
4.	Die EXTRACT-PLATE 48 ausleeren und Restflüssigkeit durch Ausklopfen auf einer saugfähigen Unterlage entfernen.
5.	400 µl ELUTION-BUFF in die entsprechenden Kavitäten der EXTRACT-PLATE 48 pipettieren. Platte mit FOIL abdecken und 10 Min bei RT (20 – 25 °C) auf einem Schüttler (ca. 600 rpm) inkubieren.
6.	Jeweils 100 µl für die Derivatisierung verwenden!

6.3.2 Derivatisierung

1.	Jeweils 100 µl der extrahierten Standards, Kontrollen und Proben in die entsprechenden Kavitäten der U 48 pipettieren.
2.	Jeweils 10 µl NAOH in alle Kavitäten pipettieren.
3.	Jeweils 50 µl Ausgleichsreagenz (siehe 6.1) in alle Kavitäten pipettieren und 1 Min auf einem Schüttler (ca. 600 rpm) inkubieren.
4.	Jeweils 10 µl D-REAGENT in alle Kavitäten pipettieren.
5.	Platte mit FOIL abdecken und 2 Stunden bei RT (20 – 25 °C) auf einem Schüttler (ca. 600 rpm) inkubieren.
6.	Jeweils 200 µl Q-BUFFER in alle Kavitäten pipettieren.
7.	Für 10 Min bei RT (20 – 25 °C) auf einem Schüttler (ca. 600 rpm) inkubieren.
8.	Jeweils 50 µl für den ELISA verwenden!

6.3.3 GABA ELISA

1.	50 µl der derivatisierten Standards, Kontrollen und Proben in die entsprechenden Kavitäten der U GABA pipettieren.
2.	50 µl AS GABA in alle Kavitäten hinzugeben und kurz schütteln.
3.	Platte mit FOIL abdecken und für 15 - 20 Stunden (über Nacht) bei 2 – 8 °C inkubieren. Alternativ für 2 Stunden bei RT (20 – 25 °C) auf einem Schüttler (ca. 600 rpm) inkubieren.
4.	FOIL entfernen und den Inhalt der Kavitäten ausleeren oder absaugen. Die Kavitäten 3 mal gründlich mit 300 µl Waschpuffer waschen, ausleeren und die Restflüssigkeit jedes Mal durch Ausklopfen auf einer saugfähigen Unterlage entfernen.
5.	100 µl CONJUGATE in alle Kavitäten pipettieren.
6.	Für 30 Min bei RT (20 – 25 °C) auf einem Schüttler (ca. 600 rpm) inkubieren.
7.	Den Inhalt der Kavitäten ausleeren oder absaugen. Die Kavitäten 3 mal gründlich mit 300 µl Waschpuffer waschen, ausleeren und die Restflüssigkeit jedes Mal durch Ausklopfen auf einer saugfähigen Unterlage entfernen.
8.	100 µl SUBSTRATE in alle Kavitäten pipettieren und für 20 - 30 Min bei RT (20 – 25 °C) auf einem Schüttler (ca. 600 rpm) inkubieren. Direktes Sonnenlicht vermeiden!
9.	100 µl der STOP-SOLN in alle Kavitäten pipettieren und die Mikrotiterplatte kurz schütteln.
10.	Absorption mit einem Mikrotiterplatten-Photometer bei 450 nm (falls vorhanden gegen eine Referenzwellenlänge von 620 - 650 nm) innerhalb von 10 Minuten messen .

6.4 Testdurchführung (25 – 2 500 ng/ml)

6.4.1 Extraktion

1.	Jeweils 300 µl der verdünnten Standards, Kontrollen und unverdünnten Proben in die entsprechenden Kavitäten der EXTRACT-PLATE 48 pipettieren.
2.	Jeweils 300 µl DILUENT in alle Kavitäten pipettieren. Platte mit FOIL abdecken und 30 Min bei RT (20 – 25 °C) auf einem Schüttler (ca. 600 rpm) inkubieren.
3.	Waschschritt (2 Durchgänge) Den Inhalt der Kavitäten ausleeren und die Restflüssigkeit durch Ausklopfen auf einer saugfähigen Unterlage entfernen. 1 ml I-Puffer (siehe 6.1) hinzufügen und für 5 Min bei RT (20 – 25 °C) auf einem Schüttler (ca. 600 rpm) inkubieren. Den Inhalt der Kavitäten ausleeren und die Restflüssigkeit durch Ausklopfen auf einer saugfähigen Unterlage entfernen. 1 ml I-Puffer (siehe 6.1) hinzufügen und für 5 Min bei RT (20 – 25 °C) auf einem Schüttler (ca. 600 rpm) inkubieren.
4.	Die EXTRACT-PLATE 48 ausleeren und Restflüssigkeit durch Ausklopfen auf einer saugfähigen Unterlage entfernen.
5.	250 µl ELUTION-BUFF in die entsprechenden Kavitäten der EXTRACT-PLATE 48 pipettieren. Platte mit FOIL abdecken und 10 Min bei RT (20 – 25 °C) auf einem Schüttler (ca. 600 rpm) inkubieren.
6.	Jeweils 100 µl für die Derivatisierung verwenden!

6.4.2 Derivatisierung

1.	Jeweils 100 µl der extrahierten Standards, Kontrollen und Proben in die entsprechenden Kavitäten der 48 pipettieren.
2.	Jeweils 10 µl NAOH in alle Kavitäten pipettieren.
3.	Jeweils 50 µl Ausgleichsreagenz (siehe 6.1) in alle Kavitäten pipettieren und 1 Min auf einem Schüttler (ca. 600 rpm) inkubieren.
4.	Jeweils 10 µl D-REAGENT in alle Kavitäten pipettieren.
5.	Platte mit FOIL abdecken und 2 Stunden bei RT (20 – 25 °C) auf einem Schüttler (ca. 600 rpm) inkubieren.
6.	Jeweils 150 µl Q-BUFFER in alle Kavitäten pipettieren.
7.	Für 10 Min bei RT (20 – 25 °C) auf einem Schüttler (ca. 600 rpm) inkubieren.
8.	Jeweils 25 µl für den ELISA verwenden!

6.4.3 GABA ELISA

1.	25 µl der derivatisierten Standards, Kontrollen und Proben in die entsprechenden Kavitäten der GABA pipettieren.
2.	50 µl AS GABA in alle Kavitäten hinzugeben und kurz schütteln.
3.	Platte mit FOIL abdecken und für 15 - 20 Stunden (über Nacht) bei 2 – 8 °C inkubieren. Alternativ für 2 Stunden bei RT (20 – 25 °C) auf einem Schüttler (ca. 600 rpm) inkubieren.
4.	FOIL entfernen und den Inhalt der Kavitäten ausleeren oder absaugen. Die Kavitäten 3 mal gründlich mit 300 µl Waschpuffer waschen, ausleeren und die Restflüssigkeit jedes Mal durch Ausklopfen auf einer saugfähigen Unterlage entfernen.
5.	100 µl CONJUGATE in alle Kavitäten pipettieren.
6.	Platte mit FOIL abdecken. Für 30 Min bei RT (20 – 25 °C) auf einem Schüttler (ca. 600 rpm) inkubieren.
7.	FOIL entfernen und den Inhalt der Kavitäten ausleeren oder absaugen. Die Kavitäten 3 mal gründlich mit 300 µl Waschpuffer waschen, ausleeren und die Restflüssigkeit jedes Mal durch Ausklopfen auf einer saugfähigen Unterlage entfernen.
8.	100 µl SUBSTRATE in alle Kavitäten pipettieren und für 20 - 30 Min bei RT (20 – 25 °C) auf einem Schüttler (ca. 600 rpm) inkubieren. Direktes Sonnenlicht vermeiden!
9.	100 µl der STOP-SOLN in alle Kavitäten pipettieren und die Mikrotiterplatte kurz schütteln.
10.	Absorption mit einem Mikrotiterplatten-Photometer bei 450 nm (falls vorhanden gegen eine Referenzwellenlänge von 620 - 650 nm) innerhalb von 10 Minuten messen .

7. Berechnung der Ergebnisse

Messbereich		GABA
	Urin	49 – 7 500 ng/ml
	Plasma/Serum	25 – 2 500 ng/ml

Eine Standardkurve, mit deren Hilfe die Konzentration der unbekanntnen Proben ermittelt werden kann, wird durch Auftragen der gemessenen Standard-Extinktionen (linearer Maßstab auf der y-Achse) gegen die entsprechenden Standardkonzentrationen (logarithmischer Maßstab auf der x-Achse) erstellt.

Für die Auswertung wird eine nicht-lineare Regression (z.B.: spline, 4- parameter, akima) verwendet.

▲ *Dieser Assay ist ein kompetitiver Assay. Das bedeutet, dass die OD-Werte mit zunehmender Konzentration des Analyten sinken. OD Signale, die unterhalb der Standardkurve liegen, entsprechen einer sehr hohen Konzentration des Analyten in der gemessenen Probe und müssen als positiv gewertet werden.*

Serum/ Plasma

Die Konzentrationen der **Plasmaproben** müssen durch den **Faktor 3 dividiert** werden.

Urinproben und Kontrollen:

Die Konzentrationen der Proben und Kontrollen können direkt von der Standardkurve abgelesen werden.

Die Tagesmenge GABA, die innerhalb von 24 Stunden im Urin ausgeschieden wird, errechnet sich wie folgt:

µg/24 Stunden = µg/l x l/24 Stunden

Umrechnung

GABA (ng/ml) x 9,7 = GABA (nmol/l)

Erwarteter Referenzbereich

Es wird empfohlen, dass jedes Labor seinen eigenen Referenzwert ermittelt.

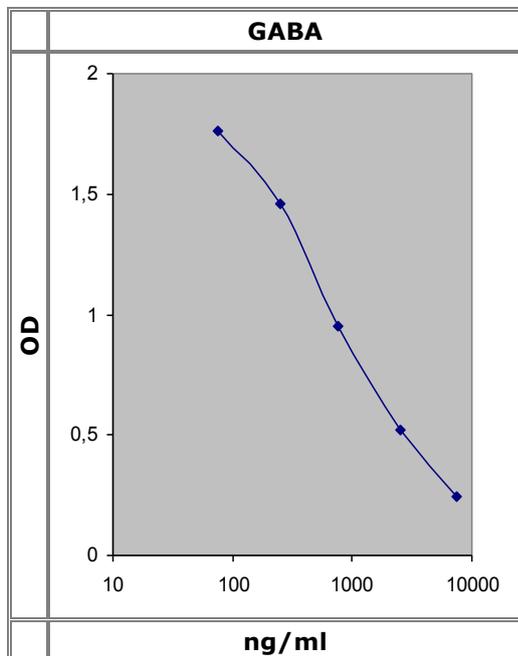
Erwarteter Referenzwert	Spontanurin	230 - 1 290 µg/g Kreatinin
--------------------------------	-------------	----------------------------

7.1 Qualitätskontrolle

Die Vertrauensbereiche der Kitkontrollen sind im QC-Report aufgeführt.

7.2 Typische Standardkurve

■ *Beispiel: bitte nicht für die Auswertung verwenden!*



8. Testcharakteristika

Sensitivität (Limit of Detection)	Spontanurin		
	49 ng/ml		

Wiederfindung	Mittelwert (%)	Bereich (%)	% Wiederfindung nach Aufstockung
	104%	96 - 116%	

Linearität	Bereich (ng/ml)	Bereich (%)	Mittelwert (%)
	35 - 4048	74-119	93

Analytische Spezifität (Kreuzreaktion)	Substanz	Kreuzreaktion (%)
		GABA
	GABA	100
	β-Alanin	1,6
	α-Aminobuttersäure	< 0,09
	Glycin	< 0,09
	L-Glutamin	< 0,09
β-Aminobuttersäure	< 0,09	

Präzision					
Intra-Assay			Inter-Assay		
Probe	Bereich (ng/ml)	CV (%)	Probe	Bereich (ng/ml)	CV (%)
1	318 ± 32	10	1	279 ± 35	12
2	723 ± 94	13	2	661 ± 73	11
3	2457 ± 110	4,9	3	1492 ± 117	7,8

9. Referenzen/Literatur

- (1) Shmais et al. Mechanism of nitrogen metabolism-related parameters and enzyme activities in the pathophysiology of autism. Journal of Neurodevelopmental Disorders 4(1):4 (2012)
- (2) El-Ansary et al. Relationship between chronic lead toxicity and plasma neurotransmitters in autistic patients from Saudi Arabia. Clinical Biochemistry, 44(23):1116-1120 (2011)
- (3) Lee et al. Astrocytes Are GABAergic Cells That Modulate Microglial Activity. Glia 59:152-165 (2011)

■ **Aktuelle Literatur oder weitere Informationen zum Test werden Ihnen auf Anforderung von Ihrem Anbieter gerne zu Verfügung gestellt.**

■ **Die Haftung des Herstellers ist auf den Ersatz defekter Produkte begrenzt. Der Hersteller übernimmt keine Haftung für Schäden, die direkt oder indirekt aus der Nutzung des Produktes entstehen.**

Symbole:

	Lagertemperatur		Hersteller		Enthält Testmaterial für <n> Teste
	Verwendbar bis		Chargennummer		In vitro Diagnostikum
	Vor Gebrauch Packungsbeilage lesen		Inhalt		CE gekennzeichnet
	Achtung		Katalog-Nummer		Nur für Forschungszwecke