

Carbonylproteine ELISA Kit

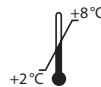
*Zur in-vitro-Bestimmung von proteingebundenen Carbonylen
in humanem Serum und Plasma*

Carbonyl Protein ELISA Kit

*For the in vitro determination of protein-bound carbonyls
in human serum and plasma*

Gültig ab / Valid from 2015-06-15

REF K 7870



IVD **CE**



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 849430

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Inhalt

1. VERWENDUNGSZWECK	2
2. EINLEITUNG	2
3. INHALT DER TESTPACKUNG	2
4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	3
5. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN	4
6. PROBENVORBEREITUNG UND -LAGERUNG	5
<i>Lagerung</i>	5
<i>Derivatisierung der Proben</i>	5
<i>Probenverdünnung</i>	5
7. TESTDURCHFÜHRUNG	5
<i>Testprinzip</i>	5
<i>Pipettierschema</i>	6
8. ERGEBNISSE	7
9. EINSCHRÄNKUNGEN	8
10. QUALITÄTSKONTROLLE	8
<i>Referenzwerte</i>	8
11. TESTCHARAKTERISTIKA	8
<i>Präzision und Reproduzierbarkeit</i>	8
<i>Spike-Wiederfindung</i>	9
12. VORSICHTSMASSNAHMEN	9
13. TECHNISCHE MERKMALE	10
14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	10
15. LITERATUR	11

1. VERWENDUNGSZWECK

Dieser ELISA-Test ist für die Bestimmung von proteingebundenen Carbonylen in humanem Serum und Plasma geeignet. Nur zur *in-vitro*-Diagnostik.

2. EINLEITUNG

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) können in der Zelle Proteine, Lipide und DNA oxidieren und sie dabei strukturell und funktionell schädigen. Die Proteine werden durch freie Radikale oxidiert, wobei ihre Aminosäuren auf verschiedene Weise modifiziert oder degradiert werden. Dabei erhalten die Proteine neue funktionelle Gruppen wie Carbonyl- oder Hydroxylgruppen, was in Proteinfragmentierung, Crosslinks-Bildung, Zerstörung der Tertiärstruktur und Funktionalitätsverlust resultieren kann. Zudem stehen ROS in direktem Zusammenhang mit Krankheiten wie z.B. Arteriosklerose, Alzheimer, Parkinson und rheumatoide Arthritis sowie mit Alterungsprozessen und Kanzerogenese.

Proteingebundene Carbonyle entstehen durch verschiedene Oxidationsmechanismen und stellen einen sensitiven Marker für oxidative Schädigung dar. Der Gehalt proteingebundener Carbonyle kann mittels Derivatisierung mit Dinitrophenylhydrazin (DNPH) und anschließender Bestimmung des gebundenen anti-DNPH-Antikörpers ermittelt werden. Die ELISA-Methode ermöglicht eine quantitative Carbonyl-Bestimmung mit Proteinmengen im Mikrogramm-Bereich.

Indikationen

- Arteriosklerose
- Alzheimer
- Parkinson
- Rheumatoide Arthritis
- Urämie
- Diabetes
- Alterungsprozesse
- Kanzerogenese

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 7870	PLATE	Mikrotiterplatte	12 x 8 Vertiefungen
K 7870	WASHBUF	Waschpufferkonzentrat (10-fach)	1 x 100 ml

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 7870	STD	Standards, lyophilisiert	4 x 5 Fläschchen
K 7870	CTRL 1	Kontrolle, lyophilisiert	4 x 1 Fläschchen
K 7870	CTRL 2	Kontrolle, lyophilisiert	4 x 1 Fläschchen
K 7870	CONJ	Konjugatkonzentrat, peroxidase markiert	1 x 200 µl
K 7870	CONJBUF	Konjugatverdünnungspuffer	1 x 15 ml
K 7870	AB	2. Antikörper (konzentriert)	1 x 200 µl
K 7870	ABBUF	Antikörperverdünnungspuffer	1 x 15 ml
K 7870	DER	Derivatisierungsreagenz	2 x 5 ml
K 7870	ASYBUF	Assaypuffer	2 x 100 ml
K 7870	SUB	TMB-Substrat	1 x 15 ml
K 7870	STOP	Stopplösung	1 x 15 ml

Für Nachbestellungen von Einzelkomponenten verwenden Sie als Bestellnummer die Artikelnummer gefolgt von der Bezeichnung.

4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Reinstwasser*
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 0,5–1000 µl
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Vortex-Mixer
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenphotometer (benötigte Filter siehe Kapitel 7)

* Immundiagnostik AG empfiehlt die Verwendung von Reinstwasser nach ISO 3696. Es handelt sich dabei um Wasser des Typs 1, welches frei von ungelösten und kolloidalen Ionen und organischen Molekülen ist (frei von Partikeln > 0,2 µm) mit einer elektrischen Leitfähigkeit von 0,055 µS/cm bei 25 °C (≥ 18,2 MΩ cm).

5. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz des Kits 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 bis zu 4x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100 µl** sollten vor Gebrauch kurz zentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.
- **Vorbereitung des Waschpuffers:** Das **Waschpufferkonzentrat (WASHBUF)** muss vor Gebrauch **1:10** in Reinstwasser verdünnt werden (100 ml WASHBUF + 900 ml Reinstwasser), 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. Der **WASH-BUF** kann bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Der **Waschpuffer** (1:10 verdünnter WASHBUF) ist bei **2–8 °C einen Monat** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- **Die lyophilisierten STD** (Standards) und die **CTRL** (Kontrollen 1 und 2) sind bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Vor Gebrauch müssen die Standards und Kontrollen rekonstituiert werden; die Rekonstitutionsvorgaben sind dem jeweiligen Spezifikationsdatenblatt zu entnehmen. **Rekonstituierte Standards und Kontrollen können nicht gelagert werden.**
- Das **DER** (Derivatisierungsreagenz) stellt eine gesättigte Lösung dar, weshalb es zu Kristallbildungen kommen kann. Das DER (Derivatisierungsreagenz) wird so verwendet.
- **Vorbereitung des 2. Antikörpers:** Der **AB** (konzentrierter 2. Antikörper) wird **1:101 in ABBUF** (Antikörperversdünnungspuffer) verdünnt (z.B. Ansatz für eine Platte: 100 µl AB + 10 ml ABBUF). Unverdünnter AB ist bei 2–8 °C bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. **2. Antikörper** (1:101 verdünnter AB) **ist nicht stabil und kann nicht aufbewahrt werden.**
- **Vorbereitung des Konjugats:** Das **Konjugatkonzentrat (CONJ)** wird unmittelbar vor Gebrauch **1:101 in Konjugatverdünnungspuffer (CONJBUF)** verdünnt (100 µl CONJ + 10 ml CONJBUF). Das CONJ ist bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. **Konjugat** (1:101 verdünntes CONJ) **ist nicht stabil und kann nicht aufbewahrt werden.**
- Alle anderen Testreagenzien sind bei **2–8 °C** zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

6. PROBENVORBEREITUNG UND -LAGERUNG

Als Probe eignen sich Serum und Plasma.

Lagerung

Die Probe sollte gekühlt versendet werden, ist aber bei Raumtemperatur bis zu 24 Stunden stabil.

Derivatisierung der Proben

1.	Beschriften Sie Röhrchen für die SAMPLES (Proben).
2.	In jedes Röhrchen entsprechend 25 µl SAMPLE (Probe) vorlegen.
3.	Zu jedem Röhrchen 100 µl DER (Derivatisierungsreagenz) hinzugegeben.
4.	Die Röhrchen schließen und auf dem Vortexer mischen.
5.	Zur Derivatisierung 30 min bei 37 °C inkubieren*.

* Alternativ kann über Nacht bei 4 °C inkubiert werden.

Probenverdünnung

Die derivatisierten Proben müssen vor Einsatz im Test **1:20 000 mit Assaypuffer** verdünnt werden:

- **30 µl** derivatisierte Probe + **570 µl** Assaypuffer, mischen
= **1:20 (Verdünnung I)**
- **30 µl** Verdünnung II + **570 µl** Assaypuffer, mischen
= **1:20 (Verdünnung II)**
- **20 µl** Verdünnung II + **980 µl** Assaypuffer, mischen
= **1:50 (Verdünnung III)**. Diese entspricht nun einer Gesamtverdünnung von 1:20000.

100 µl der **Verdünnung III** werden im Test pro Vertiefung eingesetzt.

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

Teststandards, Kontrollen und Patientenproben werden derivatisiert und anschließend auf die vorbeschichtete ELISA-Platte gebunden. Die Quantifizierung der gebundenen Proteine erfolgt durch Zugabe eines 2. Antikörpers, der biotinyliert ist. Dieser wird mit peroxidase markiertem Streptavidin detektiert. Als Peroxidasesub-

strat wird Tetramethylbenzidin (TMB) eingesetzt. Die entstandene chromogene Verbindung wird photometrisch bei 450 nm gemessen. Die Intensität der Farbe ist dem Carbonylprotein-Gehalt direkt proportional. Aus den ermittelten Standardwerten wird eine Standardkurve, optische Dichte (Absorption bei 450 nm) gegen Standardkonzentration, erstellt, aus der die Konzentrationen der Proben berechnet werden.

Pipettierschema

Vor Gebrauch **alle Reagenzien und Proben** auf **Raumtemperatur** (15–30 °C) bringen, gut mischen.

Markieren Sie die Positionen für STD/SAMPLE/CTRL (Standards/Proben/Kontrollen) im Protokollblatt.

Die benötigten Mikrotiterstreifen aus dem Kit nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen können in der verschlossenen Originalverpackung bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2–8 °C gelagert werden.

Im Fall einer automatisierten Abarbeitung des Tests können automaten-spezifische Anpassungen der Prozedur notwendig sein, um den jeweiligen technischen Gegebenheiten gerecht zu werden. Für Unterstützung und Rückfragen wenden Sie sich bitte an Ihren Anbieter oder Immundiagnostik AG.

Wir empfehlen, die Bestimmungen in Doppelwerten durchzuführen.

1.	Die beschichtete Mikrotiterplatte vor Gebrauch 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch mehrmaliges Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
2.	Je 100 µl pro STD, CTRL und SAMPLE (Verdünnung III der Proben) in die Vertiefungen der Mikrotiterplattenstreifen pipettieren.
3.	Streifen luftdicht abdecken und 1 Stunde bei 37 °C inkubieren.
4.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch mehrmaliges Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
5.	100 µl des 2. Antikörpers in alle Vertiefungen pipettieren.
6.	Streifen abdecken und 1 Stunde bei 37 °C inkubieren.
7.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch mehrmaliges Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
8.	100 µl Konjugat in alle Vertiefungen pipettieren.

9.	Streifen abdecken und 1 Stunde bei 37 °C inkubieren.
10.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch mehrmaliges Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
11.	100 µl SUB (TMB-Substrat) in alle Vertiefungen pipettieren.
12.	10–20 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren* .
13.	100 µl STOP (Stopplösung) in alle Vertiefungen pipettieren und im Mikrotiterplattenphotometer im Schüttelmodus mischen .
14.	Extinktion sofort im Mikrotiterplattenphotometer bei 450 nm gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) messen. Ist keine Referenzwellenlänge vorhanden, wird nur bei 450 nm gemessen. Falls die Extinktion des höchsten Standards den Messbereich des Photometers übersteigt, sollte sofort bei 405 nm gegen 620 nm (690 nm) gemessen werden.

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

8. ERGEBNISSE

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 z.B. 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 und für die Konzentration empfehlen wir eine lineare Ordinate bzw. Abszisse.

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.

Serum- und Plasmaproben

Der Verdünnungsfaktor der Plasma- und Serumproben ist bereits in der Standardkurve mit einberechnet, so dass keine Multiplikation der erhaltenen Ergebnisse nötig ist.

9. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben, deren OD höher ist als die des höchsten Standards, sollten stärker verdünnt und nochmals im Assay eingesetzt werden. Bei der folgenden Auswertung ist der veränderte Verdünnungsfaktor zu beachten.

10. QUALITÄTSKONTROLLE

Immundiagnostik empfiehlt den Einsatz von externen Kontrollen für die interne Qualitätskontrolle, wenn möglich.

Wir empfehlen, bei jedem Testansatz Kontrollen mitzumessen. Die Ergebnisse der Kontrollen müssen auf Richtigkeit überprüft werden. Liegen eine oder mehrere Kontrollen außerhalb des angegebenen Bereiches, kann Immundiagnostik die Richtigkeit der Messergebnisse nicht gewährleisten.

Referenzwerte

Anhand einer laborinternen Studie mit Serum- und Plasmaproben von augenscheinlich Gesunden (n = 41) wurde ein Referenzbereich von 70–200 U/ml ermittelt.

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

11. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra-Assay (n = 26)

Probe	Mittelwert Carbonylproteine [U/ml]	Standardabweichung (SD) [%]
1	280,9	6,5
2	553,4	5,2

Inter-Assay (n = 11)

Probe	Mittelwert Carbonylproteine [U/ml]	Standardabweichung (SD) [%]
1	77,9	12,5
2	170,2	6,2
3	127,7	7,9

Spike-Wiederfindung

Probe	Ungespikte Probe [U/ml]	Spike [U/ml]	erwartet [U/ml]	gemessen [U/ml]
A	66,5	33,0	99,5	90,7
	66,5	90,0	156,5	148,6
	66,5	280,0	346,5	340,6
B	140,4	33,0	173,4	171,6
	140,4	90,0	230,4	243,0
	140,4	280,0	420,4	400,0
C	116,8	33,0	149,8	130,5
	116,8	90,0	206,8	168,2
	116,8	280,0	396,8	375,2

12. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in-vitro*-Diagnostik verwendet werden.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet und für negativ befunden. Dennoch wird empfohlen, die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.
- Die Kitkomponenten enthalten zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen Natriumazid oder ProClin. Natriumazid bzw. ProClin sind giftig. Auch Substrate

für enzymatische Farbreaktionen sind als giftig und karzinogen beschrieben. Jeder Kontakt mit Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.

- Die Stopplösung besteht aus verdünnter Schwefelsäure (H_2SO_4). H_2SO_4 ist eine starke Säure und muss auch in verdünnter Form mit Vorsicht benutzt werden. H_2SO_4 verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen, Schutzkleidung und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Säure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.

13. TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien der Testpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden. Ferner dürfen Kavitäten unterschiedlicher Mikrotiterplatten, selbst der gleichen Charge, nicht zusammengefügt und zur Analyse verwendet werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Substratlösung muss vor Gebrauch farblos sein.
- Mikrotiterstreifen müssen während den Inkubationen mit Folie abgedeckt sein.
- Vermeiden Sie Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien.
- Stopfen und Verschlüsse verschiedener Reagenzien dürfen nicht vertauscht werden.
- Der Assay ist immer nach der im Kit beigelegten Arbeitsanleitung durchzuführen.

14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD-Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten wurden vom Hersteller festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundia-

agnostik AG übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.

- Bei Gewährleistungsansprüchen ist das beanstandete Material mit schriftlicher Erklärung innerhalb von 14 Tagen zum Hersteller, der Immundiagnostik AG, zurückzusenden.

15. LITERATUR

1. Beal, M. F. Oxidatively modified proteins in aging and disease. *Free radical biology & medicine* **32**, 797–803 (2002).
2. Berlett, B. S. & Stadtman, E. R. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *The Journal of biological chemistry* **272**, 20313–6 (1997).
3. Buss, H., Chan, T. P., Sluis, K. B., Domigan, N. M. & Winterbourn, C. C. Protein carbonyl measurement by a sensitive ELISA method. *Free radical biology & medicine* **23**, 361–6 (1997).
4. Cao, G. & Cutler, R. G. Protein oxidation and aging. I. Difficulties in measuring reactive protein carbonyls in tissues using 2,4-dinitrophenylhydrazine. *Archives of biochemistry and biophysics* **320**, 106–14 (1995).
5. Davies, K. J., Delsignore, M. E. & Lin, S. W. Protein damage and degradation by oxygen radicals. II. Modification of amino acids. *The Journal of biological chemistry* **262**, 9902–7 (1987).
6. Dean, R. T., Fu, S., Stocker, R. & Davies, M. J. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *The Biochemical journal* **324** (Pt 1, 1–18 (1997).
7. Descamps-Latscha, B. & Witko-Sarsat, V. Importance of oxidatively modified proteins in chronic renal failure. *Kidney international. Supplement* **78**, S108–13 (2001).
8. Galli, F. Protein damage and inflammation in uraemia and dialysis patients. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* **22** Suppl 5, v20–36 (2007).
9. Gladstone, I. M. & Levine, R. L. Oxidation of proteins in neonatal lungs. *Pediatrics* **93**, 764–8 (1994).
10. Lenz, a G. et al. Oxidatively modified proteins in bronchoalveolar lavage fluid of patients with ARDS and patients at-risk for ARDS. *The European respiratory journal* **13**, 169–74 (1999).
11. Levine, R. L. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free radical biology & medicine* **32**, 790–6 (2002).

12. Levine, R. L. & Stadtman, E. R. Oxidative modification of proteins during aging. *Experimental gerontology* **36**, 1495–502 (2001).
13. Marnett, L. J., Riggins, J. N. & West, J. D. Endogenous generation of reactive oxidants and electrophiles and their reactions with DNA and protein. *The Journal of clinical investigation* **111**, 583–93 (2003).
14. Matzi, V. et al. The impact of preoperative micronutrient supplementation in lung surgery. A prospective randomized trial of oral supplementation of combined alpha-ketoglutaric acid and 5-hydroxymethylfurfural. *European journal of cardiothoracic surgery: official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery* **32**, 776–82 (2007).
15. Reznick, A. Z. et al. Modification of plasma proteins by cigarette smoke as measured by protein carbonyl formation. *The Biochemical journal* **286** (Pt 2, 607–11 (1992).
16. Smith, C. D. et al. Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**, 10540–3 (1991).
17. Stadtman, E. R. & Oliver, C. N. Metal-catalyzed oxidation of proteins. Physiological consequences. *The Journal of biological chemistry* **266**, 2005–8 (1991).
18. Starke-Reed, P. E. & Oliver, C. N. Protein oxidation and proteolysis during aging and oxidative stress. *Archives of biochemistry and biophysics* **275**, 559–67 (1989).
19. Wiseman, H. & Halliwell, B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *The Biochemical journal* **313** (Pt 1, 17–29 (1996).

Verwendete Symbole:



Temperaturbegrenzung



Bestellnummer



In-Vitro-Diagnostikum



Zu verwenden mit



Hersteller



Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen



Chargenbezeichnung



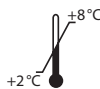
Verwendbar bis

Carbonyl protein ELISA Kit

For the in vitro determination of protein-bound carbonyls in human serum and plasma

Valid from 2015-06-15

REF **K 7870**



IVD **CE**



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 849430

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Table of Contents

1. INTENDED USE	15
2. INTRODUCTION	15
3. MATERIAL SUPPLIED	15
4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	16
5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS	16
6. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION	17
<i>Storage</i>	17
<i>Derivatisation of samples</i>	17
<i>Sample dilution</i>	18
7. ASSAY PROCEDURE	18
<i>Principle of the test</i>	18
<i>Test procedure</i>	18
8. RESULTS	20
9. LIMITATIONS	20
10. QUALITY CONTROL	20
<i>Reference range</i>	21
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	21
<i>Spiking Recovery</i>	21
<i>Precision and reproducibility</i>	21
12. PRECAUTIONS	22
13. TECHNICAL HINTS	22
14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	23
15. REFERENCES	23

1. INTENDED USE

This ELISA Kit is intended for the determination of protein carbonyls in human serum and plasma. For *in vitro* diagnostic use only.

2. INTRODUCTION

Reactive oxygen species (ROS) can oxidize proteins, lipids, and DNA, causing damage of their structure and function as well as cell injury. Proteins are oxidized by free radicals, whereby the constituent amino acids are variously modified or degraded. The modifications result in new functional groups such as carbonyl or hydroxyl groups, which may lead to protein fragmentation, formation of protein-protein cross-linkages, disruption of the tertiary structure and loss of functional activity. In addition, ROS are directly associated with diseases like atherosclerosis, rheumatoid arthritis, Alzheimer's and Parkinson's disease as well as ageing and cancerogenesis.

Protein carbonyls are formed by a variety of oxidative mechanisms and are sensitive indices of oxidative injury. The quantity of protein carbonyls in a protein sample can be determined by derivatizing with dinitrophenyl-hydrazine (DNPH) and measuring the bound anti-DNPH antibodies. The ELISA method enables carbonyls to be measured quantitatively with microgram quantities of protein.

Indications

- Atherosclerosis
- Alzheimer's disease
- Parkinson's disease
- Rheumatoid arthritis
- Uremia
- Diabetes
- Ageing
- Cancerogenesis

3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 7870	PLATE	Holder with strips	12 x 8 wells
K 7870	WASHBUF	Wash buffer concentrate (10 fold)	1 x 100 ml
K 7870	STD	Standards, lyophilized	4 x 5 vials
K 7870	CTRL 1	Control, lyophilized	4 x 1 vial
K 7870	CTRL 2	Control, lyophilized	4 x 1 vial

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 7870	CONJ	Conjugate concentrate, peroxidase-labelled	1 x 200 µl
K 7870	CONJBUF	Conjugate dilution buffer	1 x 15 ml
K 7870	AB	2nd antibody concentrate	1 x 200 µl
K 7870	ABBUF	Antibody dilution buffer	1 x 15 ml
K 7870	DER	Derivatization reagent	2 x 5 ml
K 7870	ASYBUF	Assay buffer	2 x 100 ml
K 7870	SUB	TMB substrate	1 x 15 ml
K 7870	STOP	Stop solution	1 x 15 ml

For reorders of single components, use the catalogue number followed by the label as product number.

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultra pure water*
- Calibrated precision pipettors and 0.5–1000 µl tips
- Foil to cover the microtiter plate
- Multi-channel pipets or repeater pipets
- Vortex
- Standard laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader (required filters see chapter 7)

* Immundiagnostik AG recommends the use of Ultra Pure Water (Water Type 1; ISO 3696), which is free of undissolved and colloidal ions and organic molecules (free of particles > 0.2 µm) with an electrical conductivity of 0.055 µS/cm at 25 °C (≥ 18.2 MΩ cm).

5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- To run the assay more than once, ensure that reagents are stored at the conditions stated on the label. **Prepare only the appropriate amount necessary for each run.** The kit can be used up to 4 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.
- **Preparation of the wash buffer:** Before use, the **wash buffer concentrate (WASHBUF)** must be diluted **1:10** with ultra pure water (100 ml WASHBUF + 900 ml ultra pure water), mix well. Crystals could occur due to high salt con-

centration in the stock solutions. The crystals must be redissolved at room temperature or 37 °C before dilution of the buffer solutions. The **WASHBUF** is stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. **Wash buffer** (1:10 diluted WASHBUF) can be stored in a closed flask at **2–8 °C for one month**.

- The **lyophilized standards** (STD) and **controls** (CTRL) are stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. Before use, the **STD** (standards) and **CTRL** (controls) must be reconstituted as stated in the specification data sheet. **Re-constituted standards and controls are not stable and cannot be stored.**
- The **DER** (derivatization reagent) is prepared as a saturated solution. Crystals can occur due to the high salt concentration. The DER (derivatization reagent) is used as such, without removing the crystals.
- **Preparation of the 2nd antibody:** The **AB** (2nd antibody concentrate) must be diluted **1:101 in ABBUF** (antibody dilution buffer): e. g. for one plate: 100 µl AB + 10 ml ABBUF. The **undiluted AB** is stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. **2nd antibody** (1:101 diluted AB) **is not stable and cannot be stored.**
- **Preparation of the conjugate:** The **conjugate concentrate (CONJ)** must be diluted **1:101** in conjugate dilution buffer (100 µl CONJ + 10 ml CONJBUF). The CONJ is stable at **2–8 °C** until expiry date stated on the label. **Conjugate** (1:101 diluted CONJ) **is not stable and cannot be stored.**
- All other test reagents are ready to use. Test reagents are stable until the expiry date (see label of test package) when stored at **2–8 °C**.

6. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Serum and plasma samples are suited for this test system.

Storage

Samples should be sent cooled; they are stable for 24 h at room temperature.

Derivatisation of samples

1.	Label a tube for each SAMPLE .
2.	Add to each tube 25 µl SAMPLE .
3.	Add to each tube 100 µl of DER (derivatization reagent).
4.	Close the tubes and vortex the content well.

5. For derivatization, incubate for **30 min at 37 °C***.

* Alternatively, incubate over night at 4 °C.

Sample dilution

The derivatized samples must be diluted **1:20 000 in assay buffer** before use in the test:

- **30 µl** derivatized sample + **570 µl** assay buffer, mix well
= **1:20 (dilution I)**
- **30 µl** dilution I + **570 µl** assay buffer, mix well
= **1:20 (dilution II)**
- **20 µl** dilution II + **980 µl** assay buffer, mix well
= **1:50 (dilution III)**. This results in a final dilution of 1:20 000.

For analysis, pipet **100 µl** of **dilution III** per well.

7. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

Assay standards, controls and patient samples are derivatized and added into the wells of precoated microplate. The quantification of the bound proteins is performed by adding of second antibody which is biotinylated and detected by peroxidase labeled streptavidin. Tetramethylbenzidin (TMB) is used as a peroxidase substrate. The intensity of the color is directly proportional to the concentration of carbonyl proteins. A dose response curve of the absorbance unit (optical density, OD at 450 nm) vs. concentration is generated, using the values obtained from the standard. Carbonyl proteins in the patient samples are determined directly from this curve.

Test procedure

Bring all **reagents and samples to room temperature** (15–30 °C) and mix well.

Mark the positions of STD/SAMPLE/CTRL (standards/samples/controls) on a protocol sheet.

Take as many microtiter strips as needed from kit. Store unused strips in the closed original packaging at 2–8 °C. Strips are stable until expiry date stated on the label.

For automated ELISA processors, the given protocol may need to be adjusted according to the specific features of the respective automated platform. For further details please contact your supplier or Immundiagnostik AG.

We recommend to carry out the tests in duplicate.

1.	Wash the coated microtiter plate 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper to remove excess solution.
2.	For the analysis, pipet each 100 µl of STD, CTRL or SAMPLE (dilution III of samples) from into the respective well of the microtiter plate.
3.	Cover plate tightly and incubate for 1 hour at 37 °C .
4.	Aspirate the contents of each well. Wash 5 times by dispensing 250 µl 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.
5.	Add 100 µl of 2nd antibody into each well.
6.	Cover the plate tightly and incubate for 1 hour at 37 °C .
7.	Aspirate the contents of each well. Wash 5 times by dispensing 250 µl 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.
8.	Add 100 µl of conjugate into each well.
9.	Cover the plate tightly and incubate for 1 hour at 37 °C .
10.	Aspirate the contents of each well. Wash 5 times by dispensing 250 µl 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.
11.	Add 100 µl of SUB (TMB substrate) into each well.
12.	Incubate for 10–20 min at room temperature in the dark*.
13.	Add 100 µl of STOP (stop solution) into each well, mix thoroughly.
14.	Determine absorption immediately with an ELISA reader at 450 nm against 620 nm (or 690 nm) as a reference. If no reference wavelength is available, read only at 450 nm. If the extinction of the highest standard exceeds the range of the photometer, absorption must be measured immediately at 405 nm against 620 nm as a reference.

* The intensity of the color change is temperature sensitive. We recommend observing the color change and stopping the reaction upon good differentiation.

8. 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 the optical density and a logarithmic abscissa for the concentration. When using a logarithmic abscissa, the zero standard must be specified with a value less than 1 (e.g. 0.001).

2. Point-to-point calculation

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

3. Spline algorithm

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

The plausibility of the duplicate values should be examined before the automatic evaluation of the results. If this option is not available with the programme used, the duplicate values should be evaluated manually.

Plasma and serum samples

The dilution factor of the plasma and serum samples is already taken into consideration in the serial dilution of the standards. Therefore no further multiplication of the obtained results is necessary.

9. LIMITATIONS

Samples with an OD higher than the OD of the highest standard should be further diluted and re-assayed. For the following analysis, the changed dilution factor has to be taken into consideration.

10. QUALITY CONTROL

Immundiagnostik recommends the use of external controls for internal quality control, if possible.

Control samples should be analysed 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 sample are outside the acceptable limits.

Reference range

Based on Immundiagnostik studies of matrix samples of apparently healthy persons (n = 41), a reference range of 70–200 U/ml was estimated.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS*Spiking Recovery*

Sample	Unspiked Sample [U/ml]	Spike [U/ml]	expected [U/ml]	measured [U/ml]
A	66.5	33.0	99.5	90.7
	66.5	90.0	156.5	148.6
	66.5	280.0	346.5	340.6
B	140.4	33.0	173.4	171.6
	140.4	90.0	230.4	243.0
	140.4	280.0	420.4	400.0
C	116.8	33.0	149.8	130.5
	116.8	90.0	206.8	168.2
	116.8	280.0	396.8	375.2

*Precision and reproducibility***Intra-Assay (n = 26)**

Sample	Carbonyl proteins mean value [U/ml]	Standard deviation (SD) [%]
1	280.9	6.5
2	553.4	5.2

Inter-Assay (n = 14)

Sample	Carbonyl proteins mean value [U/ml]	Standard deviation (SD) [%]
1	77.9	12.5
2	170.2	6.2
3	127.7	7.9

12. PRECAUTIONS

- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- Control samples should be analyzed with each run.
- Human materials used in kit components were tested and found to be negative for HIV, Hepatitis B and Hepatitis C. However, for safety reasons, all kit components should be treated as potentially infectious.
- Kit reagents contain sodium azide or Proclin as bactericides. Sodium azide and Proclin are toxic. Substrates for the enzymatic color reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.
- The stop solution consists of diluted sulphuric acid, a strong acid. Although diluted, it still must be handled with care. It can cause burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spill should be wiped up immediately with copious quantities of water. Do not breath vapour and avoid inhalation.

13. TECHNICAL HINTS

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay. Furthermore we recommend not assembling wells of different microtiter plates for analysis, even if they are of the same batch.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated on kit label.
- Substrate solution should remain colourless until use.
- To ensure accurate results, proper adhesion of plate sealers during incubation steps is necessary.
- Avoid foaming when mixing reagents.

- Do not mix plugs and caps from different reagents.
- The assay should always be performed according the enclosed manual.

14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and distributed according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- The guidelines for medical laboratories should be followed.
- 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 incorrect use.
- Warranty claims and complaints regarding deficiencies must be logged within 14 days after receipt of the product. The product should be send to Immundiagnostik AG along with a written complaint.

15. REFERENCES

1. Beal, M. F. Oxidatively modified proteins in aging and disease. *Free radical biology & medicine* **32**, 797–803 (2002).
2. Berlett, B. S. & Stadtman, E. R. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *The Journal of biological chemistry* **272**, 20313–6 (1997).
3. Buss, H., Chan, T. P., Sluis, K. B., Domigan, N. M. & Winterbourn, C. C. Protein carbonyl measurement by a sensitive ELISA method. *Free radical biology & medicine* **23**, 361–6 (1997).
4. Cao, G. & Cutler, R. G. Protein oxidation and aging. I. Difficulties in measuring reactive protein carbonyls in tissues using 2,4-dinitrophenylhydrazine. *Archives of biochemistry and biophysics* **320**, 106–14 (1995).
5. Davies, K. J., Delsignore, M. E. & Lin, S. W. Protein damage and degradation by oxygen radicals. II. Modification of amino acids. *The Journal of biological chemistry* **262**, 9902–7 (1987).
6. Dean, R. T., Fu, S., Stocker, R. & Davies, M. J. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *The Biochemical journal* **324** (Pt 1, 1–18 (1997).
7. Descamps-Latscha, B. & Witko-Sarsat, V. Importance of oxidatively modified proteins in chronic renal failure. *Kidney international. Supplement* **78**, S108–13

- (2001).
8. Galli, F. Protein damage and inflammation in uraemia and dialysis patients. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* **22** Suppl 5, v20–36 (2007).
 9. Gladstone, I. M. & Levine, R. L. Oxidation of proteins in neonatal lungs. *Pediatrics* **93**, 764–8 (1994).
 10. Lenz, a G. et al. Oxidatively modified proteins in bronchoalveolar lavage fluid of patients with ARDS and patients at-risk for ARDS. *The European respiratory journal* **13**, 169–74 (1999).
 11. Levine, R. L. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free radical biology & medicine* **32**, 790–6 (2002).
 12. Levine, R. L. & Stadtman, E. R. Oxidative modification of proteins during aging. *Experimental gerontology* **36**, 1495–502 (2001).
 13. Marnett, L. J., Riggins, J. N. & West, J. D. Endogenous generation of reactive oxidants and electrophiles and their reactions with DNA and protein. *The Journal of clinical investigation* **111**, 583–93 (2003).
 14. Matzi, V. et al. The impact of preoperative micronutrient supplementation in lung surgery. A prospective randomized trial of oral supplementation of combined alpha-ketoglutaric acid and 5-hydroxymethylfurfural. *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery* **32**, 776–82 (2007).
 15. Reznick, A. Z. et al. Modification of plasma proteins by cigarette smoke as measured by protein carbonyl formation. *The Biochemical journal* **286** (Pt 2, 607–11 (1992).
 16. Smith, C. D. et al. Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**, 10540–3 (1991).
 17. Stadtman, E. R. & Oliver, C. N. Metal-catalyzed oxidation of proteins. Physiological consequences. *The Journal of biological chemistry* **266**, 2005–8 (1991).
 18. Starke-Reed, P. E. & Oliver, C. N. Protein oxidation and proteolysis during aging and oxidative stress. *Archives of biochemistry and biophysics* **275**, 559–67 (1989).
 19. Wiseman, H. & Halliwell, B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *The Biochemical journal* **313** (Pt 1, 17–29 (1996).

Used symbols:

Temperature limitation



Catalogue Number



In Vitro Diagnostic Medical Device



To be used with



Manufacturer



Contains sufficient for <n> tests



Lot number



Use by