

Arbeitsanleitung / Manual

Phenylalanin ELISA Kit

Zur in-vitro-Bestimmung von Phenylalanin in humanem EDTA-Plasma und Serum

Phenylalanine ELISA Kit

For the in vitro determination of phenylalanine in human EDTA plasma and serum

Nur zu Forschungszwecken / For research use only

Gültig ab / Valid from 2015-04-24

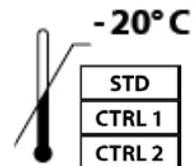


K 7014



+2°C

+8°C



-20°C



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

Inhalt

1. VERWENDUNGSZWECK	2
2. INHALT DER TESTPACKUNG	2
3. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	2
4. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN	3
5. PROBENVORBEREITUNG UND -LAGERUNG	4
6. TESTDURCHFÜHRUNG	5
<i>Testprinzip</i>	5
<i>Pipettierschema Probenvorbereitung</i>	5
<i>Pipettierschema Testdurchführung</i>	6
7. ERGEBNISSE	7
8. EINSCHRÄNKUNGEN	9
9. QUALITÄTSKONTROLLE	9
<i>Referenzwerte</i>	10
10. TESTCHARAKTERISTIKA	10
<i>Präzision und Reproduzierbarkeit</i>	10
<i>Spike-Wiederfindung</i>	10
<i>Wiederfindung in der Verdünnung</i>	11
<i>Analytische Sensitivität</i>	11
<i>Spezifität</i>	11
<i>Korrelation mit HPLC-MS</i>	12
11. VORSICHTSMASSNAHMEN	12
12. TECHNISCHE MERKMALE	13
13. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	13
14. LITERATUR	13

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die Bestimmung von Phenylalanin in humanem EDTA-Plasma und Serum geeignet. Nur für wissenschaftliche Forschung. Nicht für diagnostische Zwecke.

2. INHALT DER TESTPACKUNG

Art. Nr.	Bezeichnung	Kit Komponenten	Menge
K 7014MTP	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 7014ST	STD	Standards, gebrauchsfertig (0, 3, 10, 30, 100, 600 µM)	6 x 200 µl
K 7014KO1 K 7014KO2	CTRL 1 CTRL 2	Kontrollen, gebrauchsfertig (Bereich der Spezifikation entnehmen)	2 x 200 µl
K 7014WP	WASHBUF	ELISA-Waschpufferkonzentrat, 10x	2 x 100 ml
K 7014AK	AB	Phenylalanin-Antikörper, lyophilisiert	2 x 1 Fläschchen
K 7014K	2.AB	POD-Antikörper, Konzentrat 200 x	1 x 90 µl
K 7014CSP	2.ABDIL	Konjugatstabilisierungspuffer, gebrauchsfertig	1 x 16 ml
K 7014RP	REABUF	Reaktionspuffer, gebrauchsfertig	2 x 100 ml
K 7014DR	DER	Derivatisierungsreagenz	2 x 13,3 mg
K 7014LM	DMSO	Dimethylsulfoxid (DMSO)	1 x 2 ml
K 7014AP	ASYBUF	Assaypuffer, gebrauchsfertig	2 x 30 ml
K 7014TMB	SUB	TMB-Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 7014AC	STOP	ELISA-Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml

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

3. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Reinstwasser*
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10 - 1000 µl

- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Vortex-Mixer
- Zentrifuge, 3000 g
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenphotometer (benötigte Filter siehe Kapitel 6)

* 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).

4. 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 je nach Probenaufkommen bis zu 2x bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100 µl** sollten vor Gebrauch kurz anzentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.
- 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. 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)** werden eingefroren bei **-20°C** gelagert. Für den Test die Standards und Kontrollen auftauen und kurz vortexen. Standards und Kontrollen können bis zu 3x wieder eingefroren werden, das Wiedereinfrieren sollte sofort nach Entnahme erfolgen.
- **DMSO** kristallisiert bei 4°C aus. Zum Lösen das DMSO bei Raumtemperatur stehen lassen oder im Wasserbad erwärmen.

- Der Inhalt eines Fläschchens **Derivatisierungsreagenz (DER) (13,3 mg)** wird in **0,8 ml DMSO** gelöst und das Fläschchen für 5 min auf einen Horizontalschüttler gelegt. Das DER sollte **unmittelbar vor Gebrauch frisch angesetzt** werden. Falls mehrere Fläschchen benötigt werden, deren Inhalt vereinen und vor Gebrauch mischen. Nach Gebrauch ist das Restreagenz zu verwerfen. Durch die Aufteilung des DER in 2 Gefäße ist der ELISA in zwei Ansätze teilbar. **Bitte beachten:** DMSO greift Plastik an, DMSO reagiert nicht mit Polypropylen-Produkten und Glasgefäßen.
- Der Inhalt eines Fläschchens **Phenylalanin-Antikörper (AB)** wird in **3 ml verdünntem Waschpuffer** gelöst. Falls mehrere Fläschchen benötigt werden, deren Inhalt vereinen und vor Gebrauch mischen. Durch die Aufteilung des AB in 2 Gefäße ist der ELISA in zwei Ansätze teilbar. Verdünnter Phenylalanin-Antikörper ist stabil und kann **4 Wochen bei 2-8°C** aufbewahrt werden.
- Der **POD-Antikörper (2.AB)** wird **1:201** in Konjugatstabilisierungspuffer (2.ABDIL) verdünnt (**z.B. 60 µl 2.AB + 12 ml 2.ABDIL; nur die benötigte Menge ansetzen**). Unverdünnter POD-Antikörper ist bei 2-8°C bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. Verdünnter POD-Antikörper kann **1 Woche 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.

5. PROBENVORBEREITUNG UND -LAGERUNG

- Als Probe eignet sich Serum und EDTA-Plasma. Die Haltbarkeit der Proben beträgt bei 2-8°C bis zu 6 Stunden. Zur längeren Lagerung müssen die Proben bei -20°C aufbewahrt werden.
- Lipämische und hämolytische Proben beeinflussen das Testergebnis und sollten nicht verwendet werden.
- Proben mit sichtbaren Mengen an Feststoff sollten zentrifugiert werden.
- Serum- und EDTA-Plasmaproben werden für die Derivatisierung vorverdünnt (siehe Pipettierschema Probenvorbereitung).
- Zur weiteren Vorbereitung muss die Probe mit einem Derivatisierungsreagenz (DER) zur Derivatisierung des enthaltenen Phenylalanin versetzt werden (Details siehe Pipettierschema Probenvorbereitung).

6. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

Der Test basiert auf der Methode des kompetitiven Enzymimmunoassays. Zur Vorbereitung wird die zu untersuchende Probe mit einem Derivatisierungsreagenz zur Derivatisierung des enthaltenen Phenylalanins versetzt.

Anschließend wird die derivatisierte Probe mit einem polyklonalen Phenylalanin-Antiserum in einer mit Phenylalanin-Derivat (Tracer) beschichteten ELISA-Platte inkubiert. Während der Inkubation kompetitiert das Zielantigen in der Probe mit dem an die Platte gebundenen Tracer um die Bindung der polyklonalen Antikörper. Hierbei verdrängt das Zielantigen in der Probe den Antikörper aus der Bindung an den Tracer. Daher ist die Konzentration des an den Tracer gebundenen Antikörpers umgekehrt proportional zu der Konzentration des Zielantigens in der Probe.

Beim zweiten Inkubationsschritt wird ein Peroxidase-markierter Sekundärantikörper zugegeben, der an die polyklonalen anti-Phenylalanin-Antikörper 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 Phenylalanin-Konzentration in der Probe reduziert sich die Konzentration der an den Tracer gebundenen Antikörper und das Signal nimmt ab. Anhand einer mitgeführten Standardkurve – optische Dichte (Absorption bei 450 nm) versus Standardkonzentration – lassen sich die Konzentrationen der Proben ermitteln.

Pipettierschema Probenvorbereitung

Standards (STD), Kontrollen (CTRL) und Proben (SAMPLE) werden im Faktor **1:41** wie folgt verdünnt:

25 µl STD/ CTRL/ Probe + 1000 µl REABUF (Reaktionspuffer)

Bitte beachten: Proben von Patienten, die Phenylalanin-Supplementierung erhalten (z.B. im Rahmen von Depletionsstudien), müssen sehr wahrscheinlich höher verdünnt werden. Wir empfehlen, diese Proben zusätzlich 1:2 mit REABUF vorzuverdünnen.

Die Derivatisierung der Standards (STD), der Kontrollen (CTRL) und der Proben (SAMPLE) wird als Einzelbestimmung in Mikroreaktionsgefäßen (z.B. 1,5-ml-Reaktionsgefäße) durchgeführt.

Die Reagenzien dieses Kits reichen aus für 48 Derivatisierungen, welche jeweils als Doppelbestimmung in die Wells der Platte aufgetragen werden.

1. Vor Gebrauch alle **Reagenzien und Proben auf Raumtemperatur** (15-30°C) bringen, gut mischen.
2. Jeweils **100 µl der verdünnten Standards (STD), Kontrollen (CTRL) bzw. Proben (SAMPLE)** in Mikroreaktionsgefäße pipettieren.
3. **25 µl** frisch angesetztes **Derivatisierungsreagenz (DER)** in alle Reaktionsgefäße (STD, CTRL, SAMPLE) pipettieren und **gründlich mischen** (z.B. durch mehrmaliges Umdrehen, oder mehrere Sekunden vortexten). Anschließend auf einem Horizontalschüttler (180-240 rpm) **45 min bei Raumtemperatur** (15-30°C) inkubieren.
4. Anschließend in alle verwendeten Mikroreaktionsgefäße **1000 µl Assaypuffer (ASYBUF)** zugeben, gut mischen und auf einem Horizontalschüttler (180-240 rpm) **45 min bei Raumtemperatur** (15-30°C) inkubieren.

2 x 50 µl der so vorbereiteten Proben (STD, CTRL, SAMPLE) werden im ELISA als Doppelbestimmung eingesetzt.

Pipettierschema Testdurchführung

5. Positionen für Standards/Kontrollen/Proben (STD/CTRL/SAMPLE) in Doppelbestimmung in einem **Protokollblatt** markieren.
6. Benötigte **Mikrotiterstreifen (PLATE)** aus dem Kit nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen können abgeklebt bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2-8°C gelagert werden.
7. Mikrotiterstreifen **1 x mit je 250 µl** verdünntem **Waschpuffer** füllen und **ca. 10 min stehen lassen**, um Kristalle zu lösen. Danach **5 x mit je 250 µl** verdünntem **Waschpuffer waschen** und nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.

8.	2 x 50 µl der vorbereiteten, derivatisierten Proben (STD, CTRL, SAMPLE) aus den Mikroreaktionsgefäßen als Doppelbestimmung in die jeweiligen Vertiefungen pipettieren.
9.	50 µl Phenylalanin-Antikörper (AB) in jede Vertiefung pipettieren. Platte 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. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
12.	100 µl verdünnten POD-Antikörper (2. AB) in alle Vertiefungen pipettieren.
13.	Platte abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (15-30°C) unter Schütteln (180-240 rpm) inkubieren.
14.	Inhalt der Platte verwerfen und 5 x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
15.	100 µl TMB-Substrat (SUB) in alle Vertiefungen pipettieren.
16.	8-12 min bei Raumtemperatur (15-30°C) im Dunkeln inkubieren*.
17.	100 µl Stopplösung (STOP) in alle Vertiefungen pipettieren, gut mischen.
18.	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.

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.

7. 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.

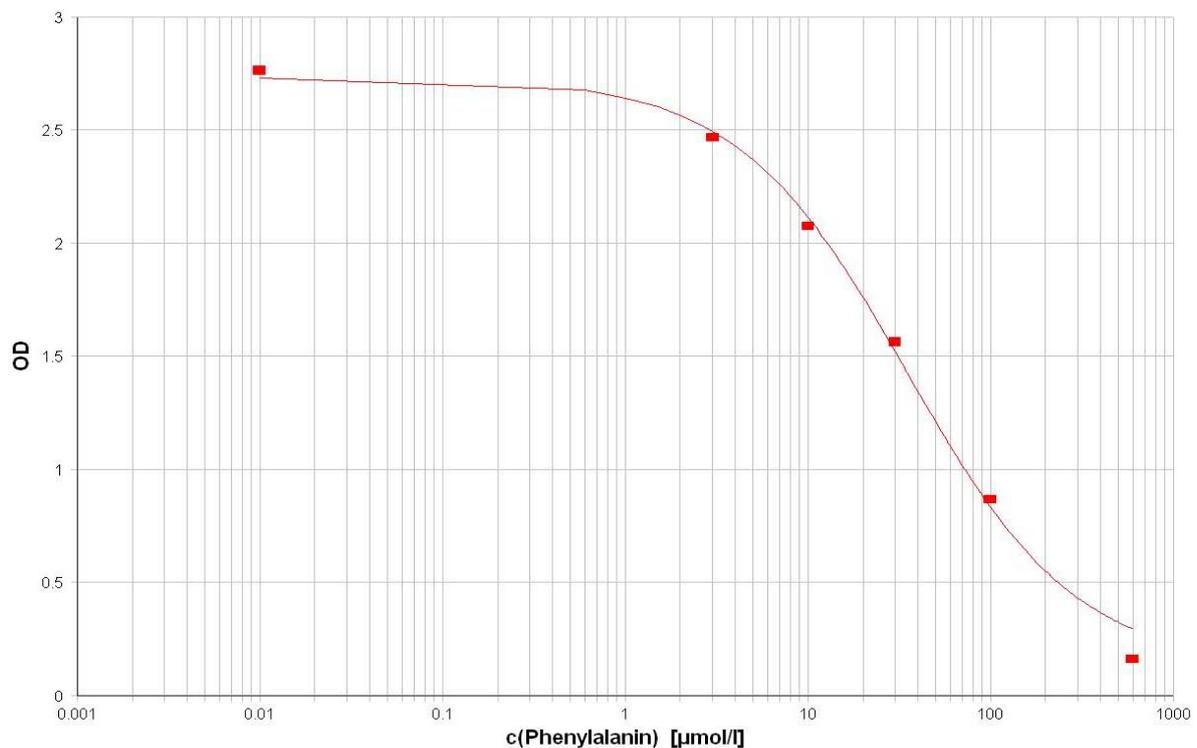
EDTA-Plasma und Serum

Wenn die Probenvorbereitung nach dem oben beschriebenen Pipettierschema durchgeführt wird, sind Standards, Kontrollen und Proben gleich verdünnt und es wird für die Berechnung der Phenylalanin-Konzentrationen kein Faktor benötigt.

Bei Proben, die zusätzlich vorverdünnt wurden, müssen die Ergebnisse mit diesem Verdünnungsfaktor multipliziert werden.

Die folgende Abbildung zeigt ein typisches Beispiel einer Standardkurve. Sie darf nicht zur Auswertung der Messwerte benutzt werden.

Musterkalibrierkurve



8. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben mit Phenylalanin-Konzentrationen über 600 $\mu\text{mol/l}$ müssen stärker verdünnt und gegebenenfalls nochmals im Assay gemessen werden. Bitte beachten Sie diesen zusätzlichen Verdünnungsfaktor bei der Ergebnisberechnung.

9. 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 Plasma-Proben von augenscheinlich gesunden Personen (n=40) wurde ein Mittelwert von 97 µmol/l ermittelt, bei einer Standardabweichung von 19,7 µmol/l.

Plasma-Mittelwert ± 2 Standardabweichungen: **97 ± 39,4 µmol/l**
Normalbereich: **57,6 - 136,4 µmol/l**

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

10. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra-Assay (n=10)

Probe	Phenylalanin [µmol/l]	VK [%]
1	47,8	8,3
2	83,6	10,2

Inter-Assay (n=6)

Probe	Phenylalanin [µmol/l]	VK [%]
1	45,5	10,9
2	79,5	5,1

Spike-Wiederfindung

Eine Plasmaprobe wurde mit unterschiedlichen Mengen an Phenylalanin versetzt (Spike) und anschließend im ELISA gemessen. Die mittlere Wiederfindung betrug 103,07 % (n=10).

Spike [$\mu\text{mol/l}$]	Phenylalanin erwartet [$\mu\text{mol/l}$]	Phenylalanin gemessen [$\mu\text{mol/l}$]	Wiederfindung [%]
0		40,9	
20	60,9	62,0	101,8
50	90,9	97,7	107,5

Wiederfindung in der Verdünnung

Eine mit Phenylalanin gespikete Plasmaprobe wurde verdünnt und im Test gemessen. Die mittlere Wiederfindung betrug 100,8 % (n=10).

Verdünnung	Phenylalanin erwartet [$\mu\text{mol/l}$]	Phenylalanin gemessen [$\mu\text{mol/l}$]	Wiederfindung [%]
original		97,7	
1:1,5	65,1	62,0	95,1
1:2	48,8	52,4	107,4

Analytische Sensitivität

Die Nachweisgrenze wurde festgelegt als $B_0 - 2 \text{ SD}$. Gemessen wurde 48 x der Standard Null. Die Messungen ergaben eine Nachweisgrenze von 3,75 $\mu\text{mol/l}$.

Probe	Phenylalanin Mittelwert [OD]	2 Standard- abweichungen (2 x SD)	Nachweis- grenze [$\mu\text{mol/l}$]
Standard Null	1,5	0,1	3,75

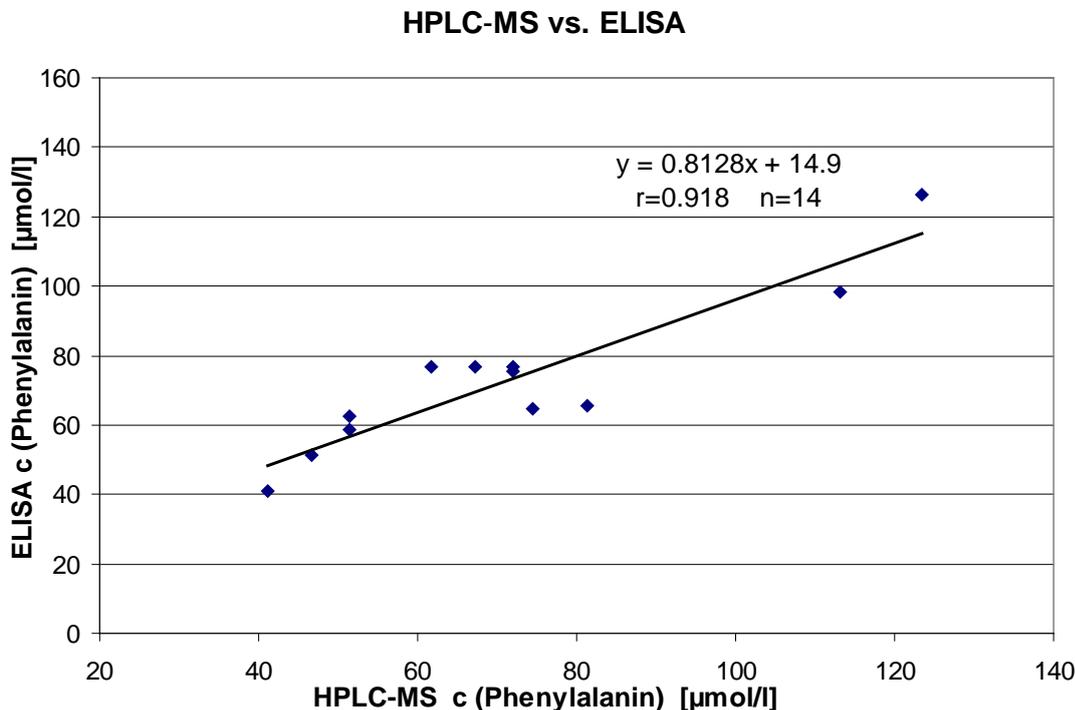
Spezifität

Die Spezifität wurde nachgewiesen durch Bestimmung der Kreuzreaktivität verwandter Substanzen. Die Kreuzreaktivität wird angegeben in Prozent, bezogen auf die Phenylalanin-Reaktivität.

L-Tyrosin < 0,02%

Korrelation mit HPLC-MS

Die Korrelation mit HPLC-MS wurde anhand von 14 Proben ermittelt, sie betrug $r = 0,918$.



11. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zu Forschungszwecken verwendet 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 Natriumazid oder Thimerosal zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen. Natriumazid bzw. Thimerosal 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 im verdünnten Zustand 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.

12. 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.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen 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 beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.

13. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- 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 Immunodiagnostik 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 Immunodiagnostik AG, zurückzusenden.

14. LITERATUR

- Badawy AA, Dougherty DM, Richard DM. Specificity of the acute tryptophan and tyrosine plus phenylalanine depletion and loading tests I. Review of

biochemical aspects and poor specificity of current amino Acid formulations. Int J Tryptophan Res. 2010 Jan 1;2010(3):23-34.

- Badawy AA, Dougherty DM, Richard DM. Specificity of the Acute Tryptophan and Tyrosine Plus Phenylalanine Depletion and Loading Tests Part II: Normalisation of the Tryptophan and the Tyrosine Plus Phenylalanine to Competing Amino Acid Ratios in a New Control Formulation. Int J Tryptophan Res. 2010;3:35-47.
- Robinson OJ, Standing HR, DeVito EE, Cools R, Sahakian BJ. Dopamine precursor depletion improves punishment prediction during reversal learning in healthy females but not males. Psychopharmacology (Berl). 2010 Aug;211(2):187-95.
- Singhatiraj E, Ngamreungphong S, Nugent K. Acute dopamine depletion syndrome. J Am Geriatr Soc. 2010 Aug;58(8):1600-1.
- van Spronsen FJ, de Groot MJ, Hoeksma M, Reijngoud DJ, van Rijn M. Large neutral amino acids in the treatment of PKU: from theory to practice. J Inherit Metab Dis. 2010 Oct 26.

Verwendete Symbole:

	Temperaturbegrenzung		Bestellnummer
	Nur für Forschungszwecke		Zu verwenden mit
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Chargenbezeichnung		Verwendbar bis

Manual

Phenylalanine ELISA Kit

For the in vitro determination of phenylalanine in human EDTA plasma and serum

For research use only

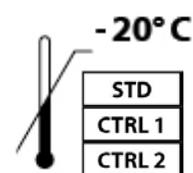
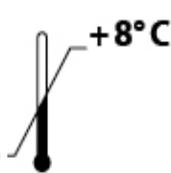
Valid from 2015-04-24



K 7014



+2°C



STD
CTRL 1
CTRL 2



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

Table of Contents

1. INTENDED USE	17
2. MATERIAL SUPPLIED	17
3. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	17
4. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS	18
5. PREPARATION AND STORAGE OF SAMPLES	19
6. ASSAY PROCEDURE	19
<i>PRINCIPLE OF THE TEST</i>	19
<i>SAMPLE PREPARATION PROCEDURE</i>	20
<i>TEST PROCEDURE</i>	21
7. RESULTS	22
8. LIMITATIONS	24
9. QUALITY CONTROL	24
<i>REFERENCE RANGE</i>	24
10. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	24
<i>PRECISION AND REPRODUCIBILITY</i>	24
<i>SPIKING RECOVERY</i>	25
<i>DILUTION RECOVERY</i>	25
<i>ANALYTICAL SENSITIVITY</i>	26
<i>SPECIFICITY</i>	26
<i>CORRELATION WITH HPLC-MS</i>	26
11. PRECAUTIONS	27
12. TECHNICAL HINTS	27
13. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	27
14. REFERENCES	28

1. INTENDED USE

This Immundiagnostik assay is intended for the quantitative determination of phenylalanine in human EDTA plasma and serum. For research use only. Not for use in diagnostic procedures.

2. MATERIAL SUPPLIED

Catalog No	Label	Kit Components	Quantity
K 7014MTP	PLATE	Holder with precoated strips	12 x 8 wells
K 7014ST	STD	Standards, ready to use (0, 3, 10, 30, 100, 600 μ M)	6 x 200 μ l
K 7014KO1 K 7014KO2	CTRL 1 CTRL 2	Controls, ready to use (see specification for range)	2 x 200 μ l
K 7014WP	WASHBUF	Wash buffer concentrate, 10x	2 x 100 ml
K 7014AK	AB	Phenylalanine antibody, lyophilized	2 x 1 vial
K 7014K	2.AB	POD antibody (concentrate, 200x)	1 x 90 μ l
K 7014CSP	2.ABDIL	Conjugate stabilizing buffer, ready to use	1 x 16 ml
K 7014RP	REABUF	Reaction buffer, ready to use	2 x 100 ml
K 7014DR	DER	Derivatization reagent	2 x 13.3 mg
K 7014LM	DMSO	Dimethylsulfoxide (DMSO)	1 x 2 ml
K 7014AP	ASYBUF	Assay buffer, ready to use	2 x 30 ml
K 7014TMB	SUB	TMB substrate (Tetramethylbenzidine), ready to use	1 x 15 ml
K 7014AC	STOP	ELISA stop solution, ready to use	1 x 15 ml

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

3. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultra pure water*
- Calibrated precision pipets and 10-1000 μ l tips
- Foil to cover the microtiter plate

- Horizontal microtiter plate shaker
- Multi-channel pipets or repeater pipets
- Vortex
- Centrifuge, 3000 g
- Standard laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader (required filters see chapter 6)

* 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).

4. 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 assay.** The kit can be used up to 2 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 ultra pure water **1:10** before use (**100 ml WASHBUF + 900 ml ultra pure water**), 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 wash buffer concentrate 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**.
- Store **Standards (STD) and controls (CTRL1, CTRL2)** frozen at **-20°C**, thaw before use in the test and mix well. Re-freeze standards and controls immediately after use. They can be re-frozen up to 3 times.
- **DMSO** could crystallize at 4°C. Dissolve the crystals at room temperature or in a water bath.
- Dissolve the content of one vial of **derivatization reagent (DER) (13.3 mg) in 0.8 ml DMSO**. Put the vial on a horizontal shaker for 5 min. DER must be **prepared immediately before use**. When more than one vial is to be used, combine the contents and mix prior to use. Discard any rest of the reagent after use. The ELISA kit can be separated into two performances by providing

two DER vials. **Please note:** DMSO attacks all plastics but not polypropylene products and laboratory glass.

- Dissolve the content of one vial of **phenylalanine antibody (AB)** in **3 ml of diluted wash buffer**. When more than one vial is to be used, combine the contents and mix prior to use. The ELISA kit can be separated into two performances by providing two AB vials. Diluted anti-phenylalanine antibody can be stored at **2-8°C for 4 weeks**.
- Dilute the **POD antibody (2.AB) 1:201** with conjugate stabilizing buffer (2.ABDIL) (**e.g. 60 µl 2.AB + 12 ml 2.ABDIL, prepare only the required amount**). The undiluted POD antibody (2.AB) is stable at 2-8°C until the expiry date stated on the label. Diluted POD antibody can be stored at **2-8°C for 1 week**.
- 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**.

5. PREPARATION AND STORAGE OF SAMPLES

- Serum and EDTA-Plasma are stable for up to 6 hours at 2-8°C. For longer storage samples must be frozen at -20°C.
- Lipemic or hemolytic samples may give erroneous results and should not be used for analysis.
- Samples with visible amounts of precipitates should be centrifuged.
- The EDTA plasma and serum samples are diluted for derivatization (see sample preparation procedure).
- For sample preparation, a derivatization reagent (DER) for derivatization of phenylalanine is added (details are given in the sample preparation procedure).

6. ASSAY PROCEDURE

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 phenylalanine derivatization.

Afterwards, the treated samples and a polyclonal phenylalanine antiserum are incubated in wells of a microtiter plate coated with a phenylalanine-derivative

(tracer). During the incubation period, the target phenylalanine in the sample competes with the tracer immobilized on the wall of the microtiter wells for the binding of the polyclonal antibodies. The phenylalanine in the sample displaces the antibodies out of the binding to the tracer. Therefore, the concentration of the tracer-bound antibody is inverse proportional to the phenylalanine concentration in the sample.

During the second incubation step, a peroxidase-conjugated antibody is added to each microtiter well to detect the anti-phenylalanine antibodies. 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 phenylalanine concentration in the sample; this means, high phenylalanine concentration in the sample reduces the concentration of tracer-bound antibodies 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. Phenylalanine present in the patient samples is determined directly from this curve.

Sample preparation procedure

Dilute standards (STD), controls (CTRL) and samples (SAMPLE) by factor **1:41** as follows:

25 µl STD/CTRL/SAMPLE + 1000 µl REABUF (reaction buffer)

Please note: Samples from patients with phenylalanine supplementation (e.g. in depletion studies) probably require further dilution, we recommend diluting these samples additionally 1:2 with REABUF.

Derivatization of standards (STD), controls (CTRL) and samples (SAMPLE) is carried out in single analysis in vials (e.g. 1.5 ml vials).

The reagents provided with this kit are sufficient for up to 48 derivatizations, which are transferred in duplicate determinations to the wells of the microtiter plate.

1. Bring all reagents and samples to **room temperature** (15-30°C).
2. Add **100 µl of diluted standards/ controls/ samples (STD/ CTRL/ SAMPLE)** in the corresponding vial.

3. Add **25 µl** of freshly prepared **derivatization reagent (DER)** into each vial (STD, CTRL, SAMPLE) and **mix thoroughly** by repeated inversion or several seconds on a vortex mixer. Incubate for **45 min at room temperature** (15-30°C) on a **shaker** (180-240 rpm).
4. Afterwards add **1000 µl of assay buffer (ASYBUF)** into each vial, mix well and incubate for **45 min at room temperature** (15-30°C) on a **shaker** (180-240 rpm).

2 x 50 µl of each treated sample (STD, CTRL, SAMPLE) are used in the ELISA as duplicates.

Test procedure

5. Mark the positions of standards/ controls/ samples (STD/ CTRL/ 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. Fill each well **1x with 250 µl of diluted wash buffer** and **leave for approx. 10 min** to dissolve any crystals. Then, wash each well **5x with 250 µl of diluted wash buffer**. After the final washing step the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper.
8. For the analysis in duplicate, take **2 x 50 µl** of derivatized **standards (STD)/ controls (CTRL)/ samples (SAMPLE)** out of the vials and add into the respective wells of the microtiter plate.
9. Add **50 µl of phenylalanine antibody (AB)** into each well. Cover the plate tightly.
10. Incubate overnight (**15-20 hours**) at **2-8°C**.
11. Discard the contents of each well. Wash each well **5 x with 250 µl of diluted wash buffer**. After the final washing step the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper.

12.	Add 100 µl of diluted POD antibody (2. AB) into each well.
13.	Cover plate tightly and incubate for 1 hour at room temperature (15-30°C) on a horizontal shaker (180-240 rpm).
14.	Discard the contents of each well. Wash each well 5 x with 250 µl of diluted wash buffer . After the final washing step the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper.
15.	Add 100 µl of TMB substrate (SUB) into each well.
16.	Incubate for 8-12 min at room temperature (15-30°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 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 (690 nm) as a reference.

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

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.

7. 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 linear abscissa for concentration.

The plausibility of the duplicate values should be examined before automatically evaluating the results. If this option is not available within the used program, the duplicate values should be evaluated manually.

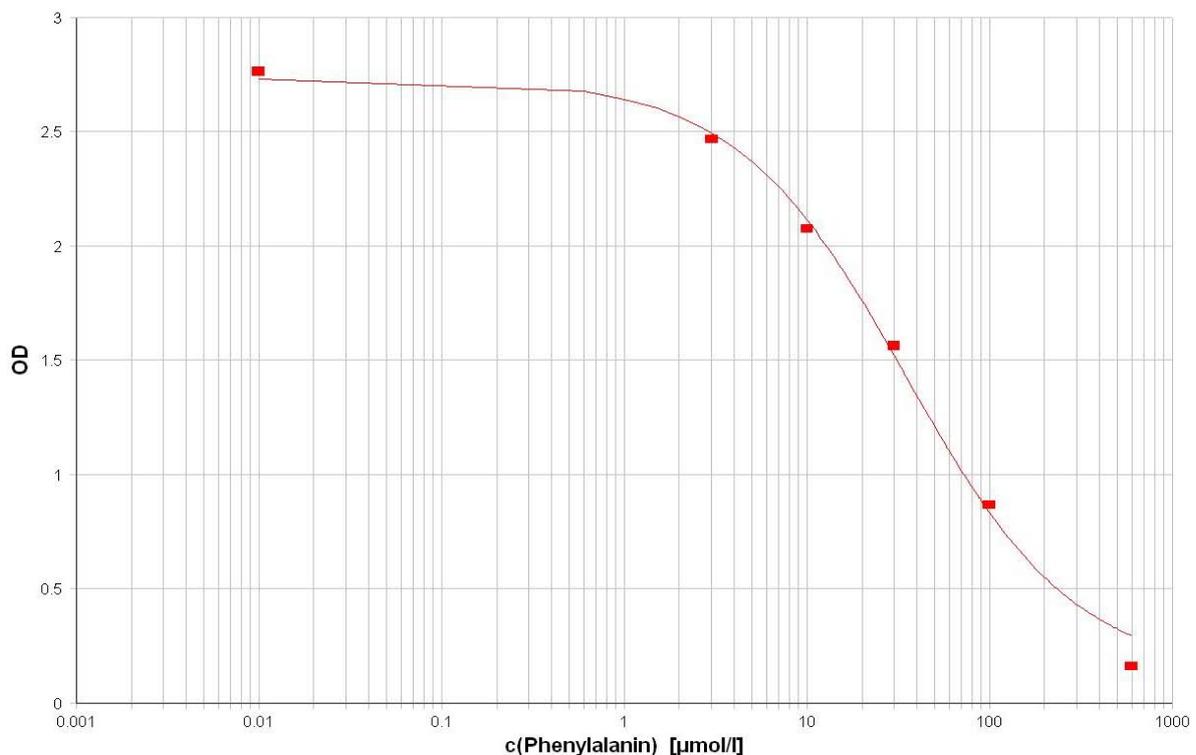
EDTA plasma and serum

No dilution factor is required for the calculation of results, if sample preparation is carried out according to the sample preparation procedure.

The results from additionally diluted samples must be multiplied by this dilution factor.

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



8. LIMITATIONS

Samples with phenylalanine concentrations above 600 µmol/l should be further diluted and re-assayed. Please consider this dilution factor when calculating the results.

9. QUALITY CONTROL

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

Control samples 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 of the acceptable limits.

Reference Range

Based on internal studies with plasma samples of apparently healthy persons (n=40) a mean value of 97 µmol/l was calculated. The standard deviation was 19.7 µmol/l.

Plasma mean value ± 2 × standard deviation: **97 ± 39.4 µmol/l**

Normal range: **57.6 - 136.4 µmol/l**

We recommend each laboratory to establish its own reference range.

10. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

Intra-assay (n=10)

Sample	Phenylalanine [µmol/l]	CV [%]
1	47.8	8.3
2	83.6	10.2

Inter-assay (n=6)

Sample	Phenylalanine [$\mu\text{mol/l}$]	CV [%]
1	45.5	10.9
2	79.5	5.1

Spiking recovery

One plasma sample was spiked with different phenylalanine concentrations and measured in this assay. The mean recovery rate for all concentrations was 103.07 % (n=10).

Spike [$\mu\text{mol/l}$]	Phenylalanine expected [$\mu\text{mol/l}$]	Phenylalanine measured [$\mu\text{mol/l}$]	Recovery [%]
0		40.9	
20	60.9	62.0	101.8
50	90.9	97.7	107.5

Dilution recovery

One spiked plasma sample was diluted and measured in this assay. The mean recovery was 100.8 % (n=10).

Dilution	Phenylalanine expected [$\mu\text{mol/l}$]	Phenylalanine measured [$\mu\text{mol/l}$]	Recovery [%]
original		97.7	
1:1.5	65.1	62.0	95.1
1:2	48.8	52.4	107.4

Analytical sensitivity

The zero-standard was measured 48 times. The detection limit was set as $B_0 - 2 \text{ SD}$ and estimated to be $3.75 \mu\text{mol/l}$.

Sample	Phenylalanine mean value [OD]	2 x standard deviation (SD)	Detection limit [$\mu\text{mol/l}$]
Zero-standard	1.5	0.1	3.75

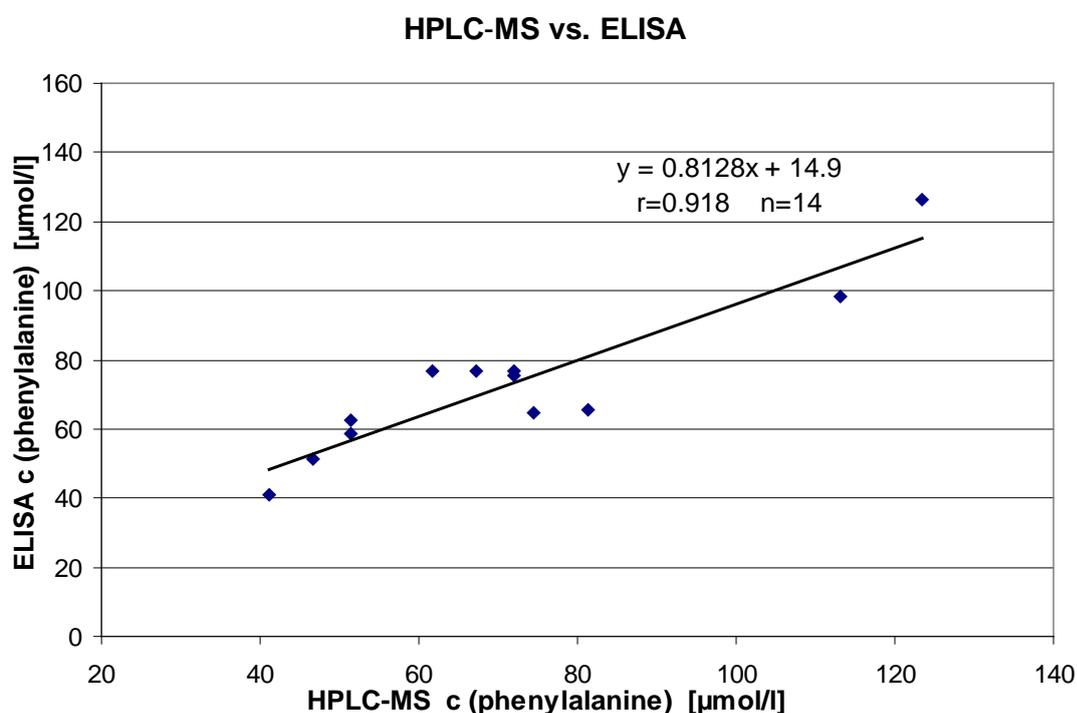
Specificity

Specificity was tested by measuring the cross-reactivity against compounds with structural similarity to phenylalanine. The specificity is calculated in percent in relation to the phenylalanine binding activity.

L-tyrosine <math>< 0.02 \%</math>

Correlation with HPLC-MS

14 samples were measured with this ELISA and HPLC-MS. The correlation was $r = 0.918$.



11. PRECAUTIONS

- All reagents in the kit package are for research use only.
- 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 thimerosal as bactericides. Sodium azide and thimerosal are toxic. Substrates for the enzymatic color reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.
- The stop solution consists of sulfuric acid, which is a strong acid. Although 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 up immediately with copious quantities of water. Do not breathe vapour and avoid inhalation.

12. 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.
- Control samples should be analyzed with each run.
- 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 to the enclosed manual.

13. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- Guidelines for medical laboratories should be followed.
- Incubation time, incubation temperature, and pipetting volumes of the different components are defined by the producer. Any variation of the test procedure which is not coordinated with the producer may influence the

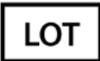
results of the test. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage resulting from incorrect use.

- Warranty claims and complaints regarding deficiencies must be logged within 14 days after receipt of the product. The product should be sent to Immundiagnostik AG along with a written complaint.

14. REFERENCES

- Badawy AA, Dougherty DM, Richard DM. Specificity of the acute tryptophan and tyrosine plus phenylalanine depletion and loading tests I. Review of biochemical aspects and poor specificity of current amino Acid formulations. *Int J Tryptophan Res.* 2010 Jan 1;2010(3):23-34.
- Badawy AA, Dougherty DM, Richard DM. Specificity of the Acute Tryptophan and Tyrosine Plus Phenylalanine Depletion and Loading Tests Part II: Normalisation of the Tryptophan and the Tyrosine Plus Phenylalanine to Competing Amino Acid Ratios in a New Control Formulation. *Int J Tryptophan Res.* 2010;3:35-47.
- Robinson OJ, Standing HR, DeVito EE, Cools R, Sahakian BJ. Dopamine precursor depletion improves punishment prediction during reversal learning in healthy females but not males. *Psychopharmacology (Berl).* 2010 Aug;211(2):187-95.
- Singhatiraj E, Ngamreungphong S, Nugent K. Acute dopamine depletion syndrome. *J Am Geriatr Soc.* 2010 Aug;58(8):1600-1.
- van Spronsen FJ, de Groot MJ, Hoeksma M, Reijngoud DJ, van Rijn M. Large neutral amino acids in the treatment of PKU: from theory to practice. *J Inherit Metab Dis.* 2010 Oct 26.

Used symbols:

	Temperature limitation		Catalogue Number
	For research use only		To be used with
	Manufacturer		Contains sufficient for <n> tests
	Lot number		Use by