

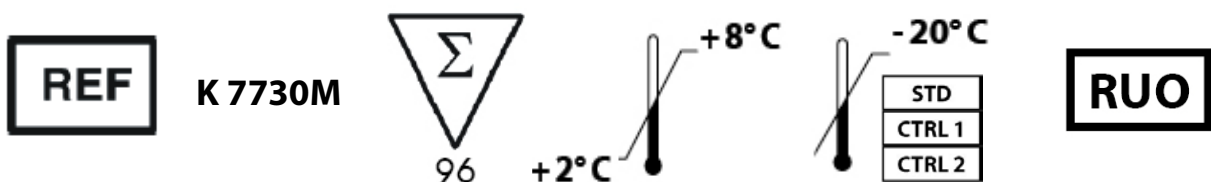
# Tryptophan ELISA Kit

*Zur in-vitro-Bestimmung von Tryptophan in Zellkulturmedien*

*For the in vitro determination of Tryptophan in cell culture media*

*Nur zu Forschungszwecken / For research use only*

Gültig ab / Valid from 15.07.2014



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

# Inhalt

<b>1. VERWENDUNGSZWECK</b>	<b>2</b>
<b>2. EINLEITUNG / KLINISCHE RELEVANZ</b>	<b>2</b>
<b>3. INHALT DER TESTPACKUNG</b>	<b>4</b>
<b>4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL</b>	<b>4</b>
<b>5. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN</b>	<b>5</b>
<b>6. PROBENVORBEREITUNG UND -LAGERUNG</b>	<b>6</b>
<b>7. TESTDURCHFÜHRUNG</b>	<b>6</b>
<i>TESTPRINZIP</i>	6
<i>PIPETTIERSCHEMA PROBENVORBEREITUNG</i>	7
<i>PIPETTIERSCHEMA TESTDURCHFÜHRUNG</i>	8
<b>8. ERGEBNISSE</b>	<b>9</b>
<b>9. EINSCHRÄNKUNGEN</b>	<b>10</b>
<b>10. QUALITÄTSKONTROLLE</b>	<b>10</b>
<b>11. VORSICHTSMASSNAHMEN</b>	<b>11</b>
<b>12. TECHNISCHE MERKMALE</b>	<b>11</b>
<b>13. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST</b>	<b>12</b>
<b>14. LITERATUR</b>	<b>12</b>

## 1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die Bestimmung von Tryptophan in Zellkulturmedien geeignet. Nur für wissenschaftliche Forschung. Nicht für diagnostische Zwecke.

## 2. EINLEITUNG / KLINISCHE RELEVANZ

Tryptophan ist eine essentielle Aminosäure. Sie wird vom menschlichen Körper nicht gebildet und muss mit der Nahrung zugeführt werden. Eine wesentliche Rolle spielt das Tryptophan bei der Serotoninsynthese. Es ist die einzige Substanz aus der Serotonin synthetisiert werden kann. (siehe Abbildung 1).

Serotonin selbst wird an den Fortsätzen eines weit ausgebreiteten Transmittersystems freigesetzt, das global-modulatorische Wirkungen besitzt und dessen Aktivität sich deshalb in unterschiedlichen Lebensbereichen auswirkt. Diese Aktivität ist nicht zuletzt auch auf den aktuellen Spiegel von Tryptophan zurückzuführen. Bei manchen Krankheitsbildern wird ein Tryptophanmangel ermittelt, der in einigen Fällen die Aktivierung des Enzyms Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) als Ursache hat. Die IDO Aktivierung bewirkt, dass Tryptophan in den Kynureninweg eingeschleust und abgebaut wird (siehe Abbildung 1).

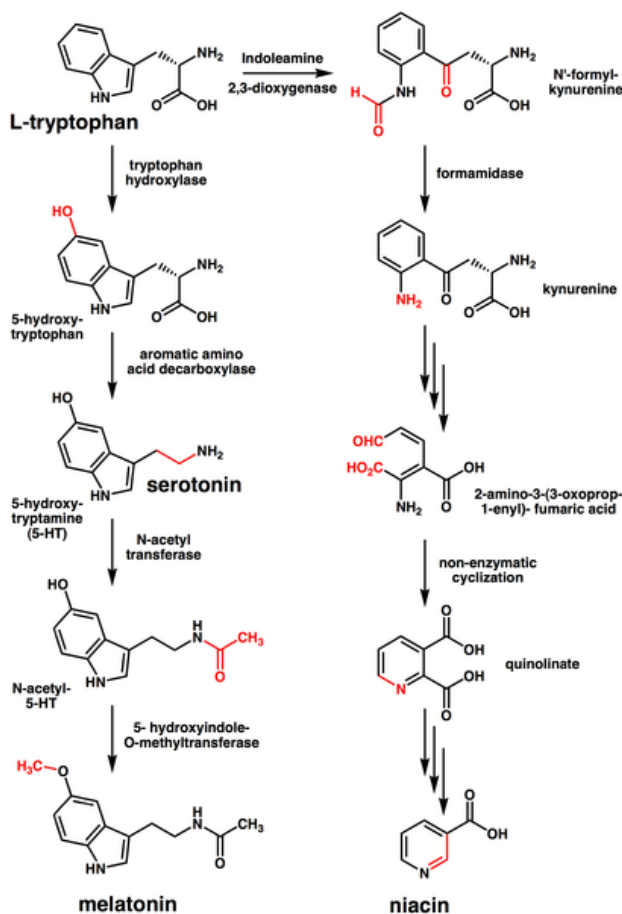


Abbildung 1: Synthese von Serotonin und Melatonin aus Tryptophan (links) und Einschleusung des Tryptophans in den Kynurenin-Weg über das Enzym Indolamin- 2,3-Dioxygenase (rechts)

Kommt es hierdurch zu einer Absenkung des Tryptophans im Plasma, so steht dieses nicht mehr der Serotonin- und im Folgenden auch nicht der Melatoninsynthese zur Verfügung. Die Resultate sind Stimmungsschwankungen oder affektive Störungen, Aggressivität, Schlafstörungen, Essstörungen oder Depressionen.

In den letzten Jahren wurden zunehmend Krankheitsbilder bekannt, bei denen aufgrund der Aktivierung der IDO oder aus anderen Gründen der Tryptophanspiegel signifikant absinkt oder ein ungünstiges Tryptophan Kynurenin-Verhältnis besteht. Im ersten Fall geht der Mangel an Tryptophan mit der Erhöhung von Entzündungsmarkern einher. Einige Indikationen sollen nachfolgend genannt sein:

- Bei **Reizdarm** aktiviert Interferon-Gamma das Enzym IDO, wodurch es zu Tryptophanmangel kommt
- Bei **adipösen Menschen** sind ebenfalls inflammatorische Marker erhöht, die eine chronische Immunaktivierung anzeigen. Auch hier ist IDO aktiviert, es sind niedrige Tryptophan-Plasmawerte zu verzeichnen
- Bei **Stress** wird die IDO ebenfalls aktiviert und begünstigt so den Tryptophanabbau über den Kynurenin-Weg

Darüber hinaus wird bei gastrointestinalen Störungen wie **Fructose-unverträglichkeit**, als Folge der Resorptionsstörungen in Dick- und Dünndarm, Tryptophan nur mangelhaft aufgenommen.

Bei diesen Krankheitsbildern sind Stimmungsschwankungen, Essstörungen, Schlafstörungen oder Depressionen bekannt.

Durch die Gabe von Tryptophan könnten diese Krankheitssymptome gemildert werden. Eine Tryptophangabe macht jedoch nur bei Kenntnis des Spiegels Sinn. Mit dem vorliegenden Test lässt sich dieser elegant bestimmen.

### 3. INHALT DER TESTPACKUNG

Artikel Nr.	Bezeichnung	Kit Komponenten	Menge
K 7730Mmtp	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 7730Mst	STD	Standards, gebrauchsfertig (0; 0,5; 1,25; 2,5; 5; 12,5 µg/ml)	3 x 6 x 200 µl
K 7730Mko1 K 7730Mko2	CTRL 1 CTRL 2	Kontrollen, gebrauchsfertig (Bereich der Spezifikation entnehmen)	3 x 2 x 200 µl
K 7730Mwp	WASHBUF	ELISA-Waschpufferkonzentrat, 10x	1 x 100 ml
K 7730Mak	AB	Anti-Tryptophan-Antikörper, lyophilisiert	4 x 1 Fläschchen
K 7730Mk	2.AB	POD-Antikörper (Konzentrat, 200x)	1 x 90 µl
K 7730Mfsp	2.ABDIL	Konjugatstabilisierungspuffer, gebrauchsfertig	1 x 16 ml
K 7730Mrp	REABUF	Reaktionspuffer, gebrauchsfertig	2 x 100 ml
K 7730Mdr	DER	Derivatisierungsreagenz	5 x 13,3 mg
K 7730Mlm	DMSO	Dimethylsulfoxid (DMSO)	1 x 7 ml
K 7730Map	ASYBUF	Assaypuffer, gebrauchsfertig	4 x 30 ml
K 7730Mtmb	SUB	TMB-Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 7730Mac	STOP	ELISA-Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml

### 4. 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 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 je nach Probenaufkommen bis zu 4x bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100 µl** sollten vor Gebrauch zentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.
- Das **Waschpufferkonzentrat (WASHBUF)** muss vor Gebrauch **1:10** in 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 4 Gefäße ist der ELISA in bis zu 4 Ansätze teilbar. **Bitte beachten:** DMSO greift Plastik an, DMSO reagiert nicht mit Polypropylen-Produkten und Glasgefäßen.

- Der Inhalt eines Fläschchens **anti-Tryptophan-Antikörper (AB)** wird in **3 ml verdünntem Waschpuffer** gelöst. Durch die Aufteilung des AB in 2 Gefäße ist der ELISA in mindestens zwei Ansätze teilbar. Verdünnter Tryptophan-Antikörper ist stabil und kann **4 Wochen bei 2-8°C** aufbewahrt werden.
- Der **POD-Antikörper (2.AB)** wird **1:200** 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.

## 6. PROBENVORBEREITUNG UND -LAGERUNG

### Zellkulturmedium

- Die Zellkulturmedium-Proben werden für die Derivatisierung vorverdünnt (siehe Pipettierschema Probenvorbereitung).
- Zur weiteren Vorbereitung muss die Probe mit einem Derivatisierungsreagenz (DER) zur Derivatisierung des enthaltenen Tryptophan versetzt werden (Details siehe Pipettierschema Probenvorbereitung).

## 7. 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 Tryptophan versetzt. Anschließend wird die derivatisierte Probe zusammen mit einem polyklonalen Tryptophan-Antiserum in einer mit Tryptophan-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 Sekundärintikörper zugegeben, der an die polyklonalen Anti-Tryptophan-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 Tryptophan-Konzentration in der Probe reduziert sich die Konzentration der an den Tracer gebundenen Antikörper und das Signal nimmt ab. Parallel dazu wird eine Standardkurve - optische Dichte (Absorption bei 450 nm) versus Standardkonzentration - erstellt, aus der die Konzentrationen der Proben ermittelt werden.

### *Pipettierschema Probenvorbereitung*

Standards (STD) und Kontrollen (CTRL) sind gebrauchsfertig.  
Es werden nur die **Proben** (SAMPLE) im Faktor **1:10** wie folgt verdünnt:

#### **10 µl Probe + 90 µl REABUF (Reaktionspuffer)**

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

1. Vor Gebrauch alle <b>Reagenzien und Proben auf Raumtemperatur</b> (15-30°C) bringen, gut mischen.
2. Jeweils <b>100 µl gebrauchsfertiger Standard (STD)</b> bzw. <b>100 µl gebrauchsfertige Kontrolle (CTRL)</b> bzw. <b>100 µl verdünnte Probe (SAMPLE)</b> in Mikroreaktionsgefäße pipettieren.
3. <b>25 µl</b> frisch angesetztes <b>Derivatisierungsreagenz (DER)</b> in alle Reaktionsgefäße (STD, CTRL, SAMPLE) pipettieren und <b>gründlich mischen</b> (z.B. durch mehrmaliges Umdrehen, oder mehrere Sekunden vortexen). Anschließend auf einem Horizontalschüttler (180-240 rpm) <b>30 min</b> bei <b>Raumtemperatur</b> (15-30°C) inkubieren.
4. Anschließend in alle verwendeten Mikroreaktionsgefäße <b>1000 µl Assaypuffer (ASYBUF)</b> zugeben, gut mischen und auf einem Horizontalschüttler (180-240 rpm) <b>45 min</b> bei <b>Raumtemperatur</b> (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 <b>Protokollblatt</b> markieren.
6. Benötigte <b>Mikrotiterstreifen (PLATE)</b> aus dem Kit nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen können abgeklebt bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2-8°C gelagert werden.
7. Mikrotiterstreifen <b>5 x mit je 250 µl</b> verdünntem <b>Waschpuffer</b> waschen und nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen
8. <b>2 x 50 µl</b> der vorbereiteten, <b>derivatisierten Proben (STD, CTRL, SAMPLE)</b> aus den Mikroreaktionsgefäßen als Doppelbestimmung in die jeweiligen Vertiefungen pipettieren.
9. <b>50 µl anti-Tryptophan-Antikörper (AB)</b> in jede Vertiefung pipettieren. Platte luftdicht abdecken.
10. Über Nacht ( <b>15-20 Stunden</b> ) bei <b>2-8°C</b> inkubieren.
11. Inhalt der Platte verwerfen und <b>5 x mit je 250 µl</b> verdünntem <b>Waschpuffer</b> waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
12. <b>100 µl</b> verdünnten <b>POD-Antikörper (2. AB)</b> in alle Vertiefungen pipettieren.
13. Platte abdecken und <b>1 Stunde bei Raumtemperatur (15-30°C)</b> unter Schütteln (180-240 rpm) inkubieren.
14. Inhalt der Platte verwerfen und <b>5 x mit je 250 µl</b> verdünntem <b>Waschpuffer</b> waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
15. <b>100 µl TMB-Substrat (SUB)</b> in alle Vertiefungen pipettieren.
16. <b>8-12 min bei Raumtemperatur (15-30°C)</b> im Dunkeln inkubieren*.
17. <b>100 µl Stopplösung (STOP)</b> in alle Vertiefungen pipettieren und im Mikrotiterplattenphotometer im Schüttelmodus 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.

## 8. ERGEBNISSE

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

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

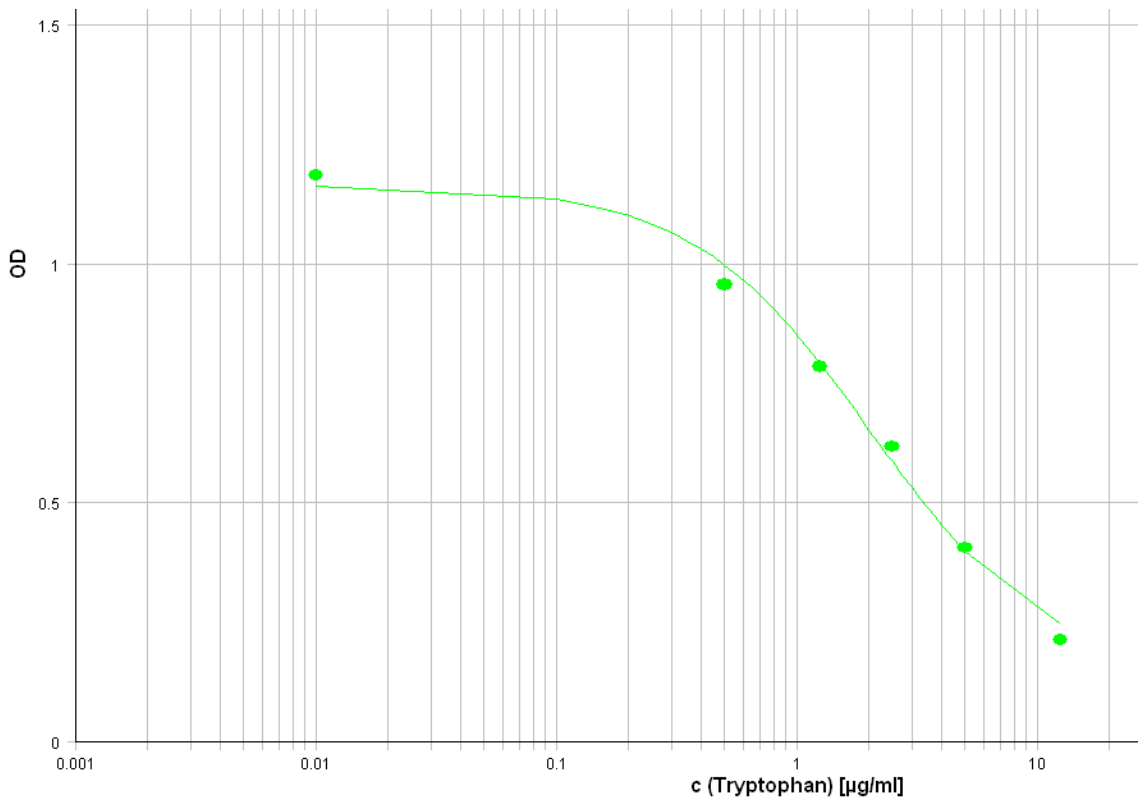
Für die optische Dichte und für die Konzentration empfehlen wir eine lineare Ordinate bzw. Abszisse.

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.

Die Konzentrationen der Kontrollen und der Proben können direkt aus der Kalibrierkurve in µg/ml abgelesen werden. Die folgende Abbildung zeigt ein

typisches Beispiel einer Standardkurve. Sie darf nicht zur Auswertung der Messwerte benutzt werden.

### Musterkalibrierkurve



## 9. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben mit Tryptophan-Konzentrationen über 12,5 µg/ml müssen stärker verdünnt und gegebenenfalls nochmals im Assay gemessen werden.

## 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.

## 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 verwendet werden.  $H_2SO_4$  verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Schwefelsäure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.

## 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

Wilson ST, Stanley B, Brent DA, Oquendo MA, Huang YY, Mann JJ: The tryptophan hydrolase-1 A218C polymorphism is associated with diagnosis, but not suicidal behavior, in borderline personality disorder. *AM J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2009 Mar 5; 150B (2): 202-8.

Richard DM, Dawes MA, Mathias CW, Acheson A, Hill-Kapturczak N, Dougherty DM: L-Tryptophan: Basic metabolic functions, behavioural research and therapeutic indications. *International Journal of Tryptophan Research* 2009; 2 45-60.

Demisch K, Bauer J, Georgi K, Demisch L. Treatment of severe chronic insomnia with L-tryptophan: Results of a double blind cross-over study. *Pharmacopsychiatry.* 1987 Nov; 20 (6): 242-4.

Komer E, Bertha G, Flooh E, et al. Sleep inducing effect of L-tryptophan. *Er Neurol.* 1986 ; 25 (Suppl 2): 107-13.

Gendall KA, Joyce PR. Meal induced changes in tryptophan:LNAAs ratio: effects on craving and binge eating. *Eat Beh* 2000; 1 (1): 53-62.

Brandacher G, Hoeller E, Fuchs D, Weiss HG. Chronic immune activation underlies morbid obesity: is IDO a key player. *Curr Drug Metab.* 2007; 8 (3): 289-95.

Breum L, Rasmussen MH, Hilsted J, Femstrom JD. Twenty-four-hour plasma tryptophan concentrations and ratio are below normal in obese subjects and are not normalised by substantial weight reduction. *Am J Clin Nutr.* 2003; 77 (5): 1112-8.

Porter RJ, Mulder RT, Joyce PR, Miller AL, Kennedy M. Tryptophan hydrolase gene (TPH1) and peripheral tryptophan level in depression. J Affect Disord. 1;109(1-2):209-12.

Almeida-Montes LG, Valles-Sanches V, Moreno-Aguilar J et al. Relation of serum cholesterol, lipid, serotonin and tryptophan levels to severity of depression and suicide attempts. J Psychiatry Neurosci. 2000 Sep; 25 (4): 371-7.

Fitzgerald P et al: tryptophan catabolism in females with irritable bowel syndrome: relationship to interferon gamma, severity of symptoms and psychiatric co-morbidity; Neurogastroenterol Motil 2008; 20: 1291-7

Hideki Miura et al: A link between stress and depression: Shifts in the balance between the kynurenine and serotonin pathways of tryptophan metabolism and the etiology and pathophysiology of depression; Stress, Volume 11, Issue 3 2008, 198-209.

#### Verwendete Symbole:



Temperaturbegrenzung



Bestellnummer



Nur für Forschungszwecke



Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen



Hersteller



Verwendbar bis



Chargenbezeichnung

Manual

# Tryptophan ELISA Kit

*For the in vitro determination of Tryptophan in in cell culture media*

*For research use only*

Valid from 15.07.2014



K 7730M



96

+2°C



+8°C



-20°C

STD
CTRL 1
CTRL 2



Immundiagnostik AG

## Table of Contents

<b>1. INTENDED USE</b>	<b>16</b>
<b>2. INTRODUCTION / CLINICAL RELEVANCE</b>	<b>16</b>
<b>3. MATERIAL SUPPLIED</b>	<b>18</b>
<b>4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED</b>	<b>18</b>
<b>5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS</b>	<b>19</b>
<b>6. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION</b>	<b>20</b>
<b>7. ASSAY PROCEDURE</b>	<b>20</b>
<i>PRINCIPLE OF THE TEST</i>	20
<i>SAMPLE PREPARATION PROCEDURE</i>	21
<i>TEST PROCEDURE</i>	21
<b>8. RESULTS</b>	<b>23</b>
<b>9. LIMITATIONS</b>	<b>24</b>
<b>10. QUALITY CONTROL</b>	<b>24</b>
<b>11. PRECAUTIONS</b>	<b>25</b>
<b>12. TECHNICAL HINTS</b>	<b>25</b>
<b>13. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE</b>	<b>25</b>
<b>14. REFERENCES</b>	<b>26</b>



## 1. INTENDED USE

This Immundiagnostik assay is intended for the quantitative determination of Tryptophan in cell culture media. For research use only. Not for use in diagnostic procedures.

## 2. INTRODUCTION / CLINICAL RELEVANCE

Tryptophan is an essential amino acid, which cannot be synthesized by humans and, therefore, must be obtained from diet. Tryptophan plays an important role in the synthesis of serotonin, as it is the only source for synthesizing serotonin (see figure 1).

Serotonin itself is released from the appendices of a widespread transmitter system with global modulating effects on different areas of life. The activity of this system depends not least on the actual tryptophan level. In some disease patterns a tryptophan deficiency is found, which is induced by an activation of the enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO). The activation of IDO causes a shifting of the metabolism of tryptophan towards the kynurenine pathway and its degradation (see figure 1).

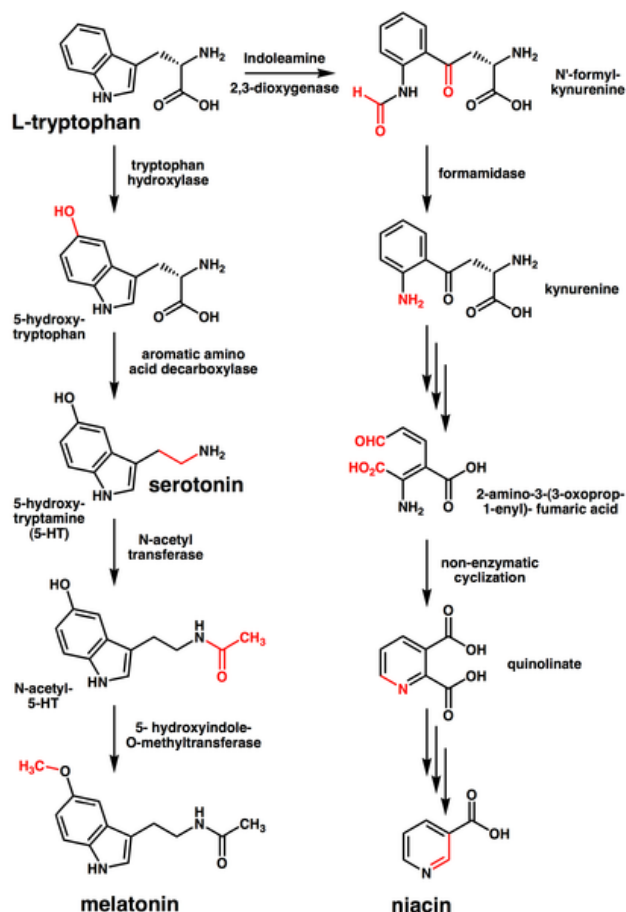


Figure 1: Synthesis of serotonin and melatonin *via* tryptophan (left), and shifting of the metabolism of tryptophan to the kynurenine-pathway *via* the enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase (right).

As a consequence, the tryptophan level in plasma is reduced and it is not available for serotonin synthesis and the following melatonin production. As a result, fluctuations of mood, aggression, sleep and eating disorder, or depression can occur.

In recent years, an increasing number of disease patterns have been detected, in which either the tryptophan level is significantly lowered due to the activation of IDO or for other reasons, or which show an adverse ratio of tryptophan-to-kynurenine levels. In the former case, the tryptophan deficiency is associated with an increase in inflammation markers. Some indications are mentioned in the following:

- In case of **irritable bowel syndrome** (IBS) interferon-gamma activates the enzyme IDO causing a tryptophan deficiency.
- In **obese patients** inflammation markers, which show a chronic activation of the immune system, are increased as well. IDO is also activated here, and the plasma tryptophan levels are low.
- **Stress** activates IDO likewise and facilitates the degradation of tryptophan *via* the kynurenine pathway.

In addition, gastrointestinal dysfunctions like **fructose intolerance** are associated with difficulties in absorbing tryptophan from the gut.

In all these disease patterns fluctuation of mood, sleep and eating disorder or depression are known.

The symptoms of these diseases can be eased by administration of tryptophan. However, such a treatment requires the knowledge of the tryptophan level, which can be determined appropriately with the now available test.

### 3. MATERIAL SUPPLIED

Catalog No	Label	Kit Components	Quantity
K 7730Mmtp	PLATE	One holder with precoated strips	12 x 8 wells
K 7730Mst	STD	Standards, ready to use (0, 0.5, 1.25, 2.5, 5, 12.5 µg/ml)	3 x 6 x 200 µl
K 7730Mko1 K 7730Mko2	CTRL 1 CTRL 2	Controls, ready to use (see specification for range)	3 x 2 x 200 µl
K 7730Mwp	WASHBUF	Wash buffer concentrate, 10x	1 x 100 ml
K 7730Mak	AB	Anti-tryptophan antibody, lyophilized	4 x 1 vial
K 7730Mk	2.AB	POD antibody (concentrate, 200x)	1 x 90 µl
K 7730Mcsp	2.ABDIL	Conjugate stabilizing buffer, ready to use	1 x 16 ml
K 7730Mrp	REABUF	Reaction buffer, ready to use	2 x 100 ml
K 7730Mdr	DER	Derivatization reagent	5 x 13.3 mg
K 7730Mlm	DMSO	Dimethylsulfoxide (DMSO)	1 x 7 ml
K 7730Map	ASYBUF	Assay buffer, ready to use	4 x 30 ml
K 7730Mtmb	SUB	TMB substrate (Tetramethylbenzidine), ready to use	1 x 15 ml
K 7730Mac	STOP	ELISA stop solution, ready to use	1 x 15 ml

### 4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultra pure water\*
- Calibrated precision pipets and 10-1000 µl tips
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- Multi-channel pipets or repeater pipets
- Centrifuge, 3000 *g*
- 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 assay more than once, ensure that reagents are stored at conditions stated on the label. **Prepare only the appropriate amount necessary for each assay.** The kit can be used up to 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.
- 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 4 performances by providing 4 DER vials. **Please note:** DMSO attacks all plastics but not polypropylene products and laboratory glass.
- Dissolve the content of one vial of **anti-tryptophan antibody (AB) in 3 ml of diluted wash buffer.** The ELISA kit can be separated into at least two performances by providing two AB vials. Diluted anti-tryptophan antibody can be stored at **2-8°C for 4 weeks.**
- Dilute the **POD antibody (2.AB) 1:200** 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**.

## 6. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

### Cell culture media

- The cell culture media samples are diluted for derivatization (see sample preparation procedure).
- For sample preparation, a derivatization reagent (DER) for derivatization of tryptophan is added (details are given in the sample preparation procedure).

## 7. 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 tryptophan derivatization. Afterwards, the treated samples and a polyclonal tryptophan antiserum are incubated in the wells of a microtiter plate coated with tryptophan derivative (tracer). During the incubation period, the target tryptophan in the sample competes with the tracer immobilized on the wall of the microtiter wells for the binding of the polyclonal antibodies. The tryptophan 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 tryptophan concentration in the sample.

During the second incubation step a peroxidase-conjugated antibody is added to each microtiter well to detect the anti-tryptophan 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 the photometer at 450 nm. The intensity of the yellow color is inverse proportional to the tryptophan concentration in the sample; this means, high tryptophan 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 standard. Tryptophan present in the patient samples is determined directly from this curve.

### *Sample preparation procedure*

Standards (STD) and controls (CTRL) are ready for use.

Dilute **samples** (SAMPLE) by factor **1:10** as follows:

**10 µl SAMPLE + 90 µl REABUF (reaction buffer)**

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

1.	Bring all reagents and samples to <b>room temperature (15-30°C)</b> , mix well.
2.	Add <b>100 µl of diluted standards/ controls/ samples (STD/ CTRL/ SAMPLE)</b> in the corresponding vial.
3.	Add <b>25 µl</b> of freshly prepared <b>derivatization reagent (DER)</b> into each vial (STD, CTRL, SAMPLE) and <b>mix thoroughly</b> by repeated inversion or several seconds on a vortex mixer. Incubate for <b>45 min at room temperature (15-30°C)</b> on a shaker (180-240 rpm).
4.	Afterwards add <b>1000 µl of assay buffer (ASYBUF)</b> into each vial, mix well and incubate for <b>45 min at room temperature (15-30°C)</b> 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 <b>protocol sheet</b> .
6.	Take as many <b>microtiter strips</b> (PLATE) as needed from kit. Store unused strips covered at 2-8°C. Strips are stable until the expiry date stated on the label.

7.	Wash the microtiter strips <b>5x with 250 µl of diluted ELISA wash buffer before use</b> . After the final washing step the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper.
8.	For the analysis in duplicate, take <b>2 x 50 µl</b> of derivatized <b>standards (STD)/ controls (CTRL)/ samples (SAMPLE)</b> out of the vials and add into the respective wells of the microtiter plate.
9.	Add <b>50 µl of anti-tryptophan antibody (AB)</b> into each well. Cover the plate tightly.
10.	Incubate overnight ( <b>15-20 hours</b> ) at <b>2-8°C</b> .
11.	Aspirate the contents of each well. Wash each well <b>5 x</b> with <b>250 µl of diluted wash buffer</b> . After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper.
12.	Add <b>100 µl</b> of diluted <b>POD antibody (2. AB)</b> into each well.
13.	Cover plate tightly and incubate for <b>1 hour at room temperature</b> (15-30°C) on a horizontal shaker (180-240 rpm).
14.	Aspirate the contents of each well. Wash each well <b>5 x</b> with <b>250 µl of diluted wash buffer</b> . After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper.
15.	Add <b>100 µl</b> of <b>TMB substrate (SUB)</b> into each well.
16.	Incubate for <b>8-12 min at room temperature</b> (15-30°C) in the dark*.
17.	Add <b>100 µl of stop solution (STOP)</b> into each well, mix thoroughly.
18.	Determine <b>absorption immediately</b> with an ELISA reader at <b>450 nm</b> 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 <b>405 nm</b> 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.

## 8. RESULTS

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

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

### 1. 4 parameter algorithm

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

### 2. Point-to-point calculation

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

### 3. Spline algorithm

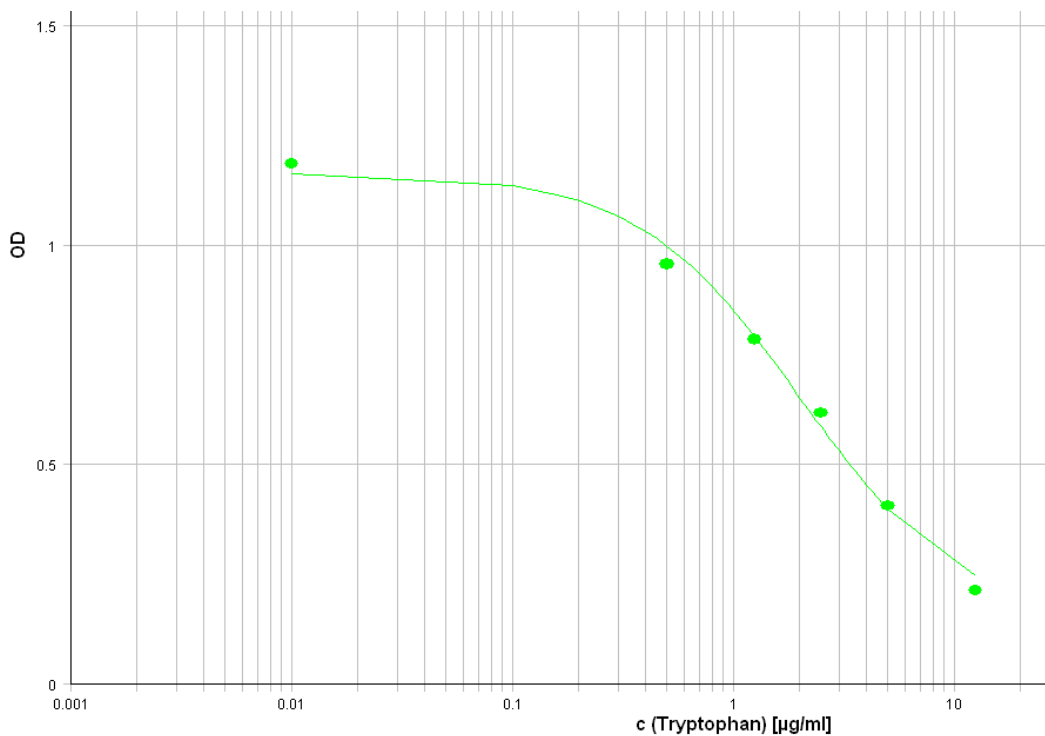
We recommend a linear ordinate for optical density and a linear abscissa for concentration.

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.

The concentration of controls and samples can be determined directly from the calibration curve in  $\mu\text{g/ml}$ . 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



## 9. LIMITATIONS

Samples with tryptophan concentrations above  $12.5 \mu\text{g/ml}$  should be further diluted and re-assayed.

## 10. 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 the acceptable limits.

## 11. PRECAUTIONS

- All reagents in the kit package are for research 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 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 out 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

Wilson ST, Stanley B, Brent DA, Oquendo MA, Huang YY, Mann JJ: The tryptophan hydrolase-1 A218C polymorphism is associated with diagnosis, but not suicidal behavior, in borderline personality disorder. *AM J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2009 Mar 5; 150B (2): 202-8.

Richard DM, Dawes MA, Mathias CW, Acheson A, Hill-Kapturczak N, Dougherty DM: L-Tryptophan: Basic metabolic functions, behavioural research and therapeutic indications. *International Journal of Tryptophan Research* 2009: 2 45-60.

Demisch K, Bauer J, Georgi K, Demisch L. Treatment of severe chronic insomnia with L-tryptophan: Results of a double blind cross-over study. *Pharmacopsychiatry.* 1987 Nov; 20 (6): 242-4.

Komer E, Bertha G, Flooh E, et al. Sleep inducing effect of L-tryptophan. *Er Neurol.* 1986 ; 25 (Suppl 2): 107-13.

Gendall KA, Joyce PR. Meal induced changes in tryptophan:LNAAs ratio: effects on craving and binge eating. *Eat Beh* 2000; 1 (1): 53-62.

Brandacher G, Hoeller E, Fuchs D, Weiss HG. Chronic immune activation underlies morbid obesity: is IDO a key player. *Curr Drug Metab.* 2007; 8 (3): 289-95.

Breum L, Rasmussen MH, Hilsted J, Femstrom JD. Twenty-four-hour plasma tryptophan concentrations and ratio are below normal in obese subjects and are not normalised by substantial weight reduction. *Am J Clin Nutr.* 2003; 77 (5): 1112-8.

Porter RJ, Mulder RT, Joyce PR, Miller AL, Kennedy M. Tryptophan hydrolase gene (TPH1) and peripheral tryptophan level in depression. *J Affect Disord.* 1;109(1-2):209-12.

Almeida-Montes LG, Valles-Sanches V, Moreno-Aguilar J et al. Relation of serum cholesterol, lipid, serotonin and tryptophan levels to severity of depression and suicide attempts. *J Psychiatry Neurosci.* 2000 Sep; 25 (4): 371-7.

Fitzgerald P et al: tryptophan catabolism in females with irritable bowel syndrome: relationship to interferon gamma, severity of symptoms and psychiatric co-morbidity; *Neurogastroenterol Motil* 2008; 20: 1291-7

Hideki Miura et al: A link between stress and depression: Shifts in the balance between the kynurenine and serotonin pathways of tryptophan metabolism and the etiology and pathophysiology of depression; *Stress*, Volume 11, Issue 3 2008, 198-209.

**Used symbols:**



Temperature limitation



Catalogue Number



For research use only



Contains sufficient for <n> tests



Manufacturer



Use by



Lot number