

Zonulin ELISA Kit

***Zur in vitro Bestimmung von Zonulin in Serum, EDTA-Plasma
und Stuhl***

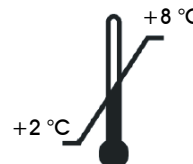
***For the in vitro determination of Zonulin in serum, EDTA-plasma
and stool***

Nur für Forschungszwecke / For research use only

Gültig ab / Valid from 05.01.2011



K 5600



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

Inhaltsverzeichnis	Seite/Page
Table of content	2
1. VERWENDUNGSZWECK	3
2. EINLEITUNG	3
3. TESTPRINZIP	4
4. INHALT DER TESTPACKUNG	5
5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	5
6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN	6
7. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN	6
8. PROBENVORBEREITUNG	7
STUHLPROBENEXTRAKTION	7
9. STANDARD- UND KONTROLLENVORBEREITUNG	9
10. TESTDURCHFÜHRUNG	9
HINWEISE	9
PIPETTIERSCHEMA	9
11. ERGEBNISSE	10
12. EINSCHRÄNKUNGEN	11
13. QUALITÄTSKONTROLLE	11
ERWARTETE ERGEBNISSE	11
14. LITERATUR	12
15. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	13

1. INTENDED USE	16
2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST	16
3. PRINCIPLE OF THE TEST	17
4. MATERIAL SUPPLIED	18
5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	18
6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS	19
7. PRECAUTIONS	20
8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION	20
EXTRACTION OF THE STOOL SAMPLE	20
9. STANDARD AND CONTROL PREPARATION	21
10. ASSAY PROCEDURE	22
PROCEDURAL NOTES	22
TEST PROCEDURE	22
11. RESULTS	23
12. LIMITATIONS	23
13. QUALITY CONTROL	24
EXPECTED VALUES	24
14. REFERENCES	24
15. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	25

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die Bestimmung von Zonulin in Serum, EDTA-Plasma und Suhl geeignet. Nur für Forschungszwecke.

2. EINLEITUNG

Zonulin ist ein humanes Protein ähnlich dem Zonula-occludens-Toxin von *Vibrio cholerae*, das an der Regulation der interzellulären Kontakte (Tight junctions) in der Darmwand beteiligt ist. Zonulin bindet an einen spezifischen Rezeptor an der Oberfläche der Epithelzellen der Darmbarriere und aktiviert eine Kaskade biochemischer Ereignisse, welche die Öffnung der Tight junctions induzieren und als Folge die Durchlässigkeit der Darmepithelzellen erhöhen, so dass verschiedene Substanzen die Darmbarriere passieren und Autoimmunreaktionen auslösen können.

Die Arbeitsgruppe um Fasano hat festgestellt, dass bei Zöliakie- und Typ 1 Diabetes-mellitus-Patienten das Zonulin-Zonulinrezeptor-System stärker aktiviert ist. Patienten mit aktiver Zöliakie zeigen erhöhte Konzentrationen von Zonulin und Zonulin-Antikörpern im Vergleich zu nicht-Zöliakiepatienten und Patienten in Remission unter glutenfreier Diät.

Im Hinblick auf den autoimmunbedingten Typ 1 Diabetes konnte in Versuchen mit Ratten gezeigt werden, dass der Anstieg der Zonulin-Spiegel und die erhöhte Durchlässigkeit der Darmwand einer Typ 1 Diabetes-erkrankung zeitlich vorausgehen. Umgekehrt konnte im Tierexperiment ein Typ 1 Diabetes verhindert werden, wenn das Protein Zonulin blockiert wurde.

Darüber hinaus wurde berichtet, dass viele Zöliakiepatienten auch an anderen Autoimmunkrankheiten leiden. Es wird vermutet, dass bei der Entwicklung von Zöliakie und anderen Autoimmunerkrankungen wie insulinabhängiger Diabetes, Multiple Sklerose und Rheumatoide Arthritis, erhöhte Zonulin-Spiegel einen entscheidenden Faktor darstellen.

3. TESTPRINZIP

Dieser Zonulin Enzymimmunoassay dient zur quantitativen Erfassung von Zonulin aus humanem Serum, EDTA-Plasma oder Stuhl.

Der Test basiert auf der Methode des kompetitiven Enzymimmunoassays. Die zu untersuchenden Proben, Standards und Kontrollen werden mit einem biotinylierten Zonulin-Tracer versetzt und anschließend in einer mit einem polyklonalen anti-Zonulin-Antikörper beschichteten ELISA-Platte inkubiert. Während der Inkubation kompetitiert das freie Zielantigen in den Proben mit dem biotinylierten Zonulin-Tracer um die Bindung der polyklonalen anti-Zonulin-Antikörper. Beim zweiten Inkubationsschritt wird Streptavidin-markierte Peroxidase zugegeben, die an den biotinylierten Zonulin-Tracer bindet. Nach einem Waschschrift zur Entfernung ungebundener Komponenten wird das Peroxidasesubstrat Tetramethylbenzidin (TMB) zugegeben. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von Säure abgestoppt. Dadurch erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die entstandene chromogene Verbindung wird photometrisch bei 450 nm gemessen. Die Intensität der Farbe ist umgekehrt proportional zur Konzentration des gemessenen Analyten, d.h. mit steigender Zonulin-Konzentration in der Probe reduziert sich die Konzentration des an den anti-Zonulin-Antikörper gebundenen biotinylierten Zonulin-Tracers und das Signal nimmt ab. Parallel dazu wird eine Standardkurve – Optische Dichte (Absorption bei 450 nm) versus Standardkonzentration - erstellt, aus der die Konzentrationen der Proben ermittelt werden.

4. INHALT DER TESTPACKUNG

Art. Nr.	Abkürzung	Kit Komponenten	Menge
K 5600MTP	MTP	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 5600WP	WASHBUF	ELISA Waschpufferkonzentrat 10x	2 x 100 ml
K 5600TR	TRACER	Tracer, biotinyliertes Zonulin	1 x 200 µl
K 5600K	CONJ	Konjugat, Streptavidin-markierte Peroxidase	1 x 200 µl
K 5600ST	STD	Standards (lyophilisiert)	2 x 7 vials
K 5600KO1	CTRL	Kontrolle (lyophilisiert)	2 x 1 vial
K 5600KO2	CTRL	Kontrolle (lyophilisiert)	2 x 1 vial
K 5600TMB	SUB	TMB Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 5600AC	STOP	ELISA Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml

5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Reinstwasser*
- Präzisionspipetten und Einmalpipettenspitzen mit variablen Volumina von 10 - 1000 µl
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Eppendorf-Gefäße, 1,5 ml
- 15 ml Röhrchen (z. B. Falcon)
- Vortex-Mixer
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenphotometer mit Filter 450 nm

*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).

6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz der Platte darauf, dass die Reagenzien, wie in der Vorschrift beschrieben, gelagert und **nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden**. Der Kit kann so bis zu 4x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100 µl** sollten vor Gebrauch zentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.
- Der **WASHBUF** (BM-Waschpufferkonzentrat) wird vor Gebrauch **1:10** in Reinstwasser verdünnt (100 ml WASHBUF + 900 ml Reinstwasser), gut mischen. Aufgrund der hohen Salzkonzentration in den Stammlösungen kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich im Wasserbad bei 37 °C auf. Der **WASHBUF** 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 lyophilisierten **STD** (Standards) und **CTRL** (Kontrollen) werden mit **500 µl** Reinstwasser rekonstituiert und zum Lösen 10 Minuten stehen gelassen. **Rekonstituierte Standards und Kontrollen können 1 Monat bei -20°C gelagert werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden.**
- Der **TRACER** (biotinylierter Zonulin-Tracer) wird **1:100** in **Waschpuffer** verdünnt (150 µl TRACER + 14,850 ml Waschpuffer). Unverdünnter **TRACER** ist bei **2-8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. **Verdünnter TRACER ist nicht stabil und kann nicht aufbewahrt werden.**
- Das **CONJ** (Konjugat) wird **1:100** in **Waschpuffer** verdünnt (100 µl CONJ + 9,9 ml Waschpuffer). Unverdünntes **CONJ** (Konjugat) ist bei **2-8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. **Verdünntes Konjugat 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.

7. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

- 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 Thimerosal. 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 in verdünnter Form mit Vorsicht verwendet 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 Schwefelsäure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.

8. PROBENVORBEREITUNG

EDTA-Plasma und Serum

Das Probenmaterial bis zur Verwendung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ lagern.

Je **75 μl frische EDTA-Plasma- oder Serumproben** in beschriftete Eppendorf-Gefäße pipettieren. **75 μl Waschpuffer** und **150 μl TRACER** zu jeder Probe zugeben, gut vortexen.

Verdünnungsfaktor 1:2

Stuhlprobenextraktion

1a. Stuhlaufbereitungssystem (SAS) (Artikel-Nr. K 6998SAS)

Stuhlröhrchen - Anwendung

Bitte beachten Sie, dass der Verdünnungsfaktor der Stuhlsuspension von der aufgenommenen Stuhlmenge und dem Puffervolumen abhängig ist:

SAS mit 0,75 ml Puffer:

Aufgenommene Stuhlmenge:	15 mg
Puffervolumen:	0,75 ml
Verdünnungsfaktor:	1:50

Als Extraktionspuffer wird Waschpuffer verwendet.

Die Aufbereitung von Stuhlproben mit Hilfe des SAS wird wie folgt durchgeführt:

- a) Die Rohprobe muss aufgetaut sein, bei auffallend inhomogenen Proben empfiehlt sich eine mechanische Homogenisierung durch Spatel, Impföse o. Ä.
- b) Das **unbefüllte Stuhlröhrchen** vor der Verwendung mit **0,75 ml** gebrauchsfertigem Extraktionspuffer **befüllen**. Wichtig: Extraktionspuffer vor Gebrauch auf Raumtemperatur bringen!
- c) Röhrchen aufschrauben (gelbes Gewinde), der untere Teil des Stäbchens weist Einkerbungen auf, welche durch Einstecken in die Stuhlprobe vollkommen mit Probe bedeckt werden müssen. Anschließend das Stäbchen durch den Abstreifring zurück ins Röhrchen stecken (leichter Widerstand) und fest verschrauben.
- d) Das Röhrchen solange mischen bis keine Stuhlreste mehr in den Einkerbungen auszumachen sind. Für die Erhebung valider Messwerte ist darauf zu achten, dass die Stuhlsuspension nach dem Mischungsprozess eine möglichst homogene Konsistenz aufweist. Bei besonders festen Stühlen kann die Homogenität der Suspension durch längeres „einweichen“ (ca. 10 min) des Stuhls in Extraktionspuffer bedeutend gesteigert werden.
- e) Nach erfolgter Suspendierung der Probe wird das Röhrchen ca. 10 Minuten stehen gelassen. Aufschwimmende Schalen von Körnern u. Ä. können hierbei vernachlässigt werden.
- f) Anschließend wird der gesamte Kopf des Stuhlröhrchens (türkiser Ring) zusammen mit dem Stäbchen vorsichtig abgeschraubt und verworfen. Bei dem Abschrauben des Kopfes ist darauf zu achten, dass das abgesetzte Sediment nicht erneut aufgewirbelt wird.

1b. Probenvorbereitungssystem der Fa. Roche Diagnostics, Mannheim (Best. Nr. 10 745 804 322)

Alternativ kann ein anderes Stuhlaufarbeitungssystem (z. B. Probenvorbereitungssystem der Fa. Roche Diagnostics, Mannheim) verwendet werden. Bei dem Roche Probenvorbereitungssystem werden 100 mg Stuhlprobe in 5 ml Extraktionspuffer mit Hilfe eines Vibrationsmischers (z. B. Vortex) homogenisiert. Anschließendes Zentrifugieren wird empfohlen.

Je **150 µl Überstand** und **150 µl TRACER** in Eppendorf-Gefäße pipettieren, gut vortexen.

Verdünnungsfaktor (1a. oder 1b.):

1:50

9. STANDARD- UND KONTROLLENVORBEREITUNG

150 µl STD bzw. CTRL in entsprechend beschriftete Eppendorf-Gefäße pipettieren, mit **150 µl TRACER** versetzen, gut mischen.

10. TESTDURCHFÜHRUNG

Hinweise

- Reagenzien der Kitpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden.
- Substratlösung muss vor Gebrauch farblos sein.
- Mikrotiterstreifen während den Inkubationen mit Folie abdecken.
- Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien vermeiden.
- Die Bestimmung ist immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.

Pipettierschema

Im Test dürfen nur Reagenzien und Proben verwendet werden, die Raumtemperatur (18-26°C) aufweisen. Vor Gebrauch Reagenzien und Proben gut mischen.

Die benötigten Streifen der Mikrotiterplatte (PLATE) aus dem Kit nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterplattenstreifen können abgeklebt bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2-8°C gelagert werden.

Die PLATE (vorbeschichtete Mikrotiterplatte) vor Gebrauch **5x mit je 250 µl** verdünntem Waschpuffer waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.

Die Bestimmungen sind in der Mikrotiterplatte in Doppelwerten durchzuführen.

1. **100 µl** der vorbehandelten **STD** (Standards), **CTRL** (Kontrollen) oder **Proben** in Doppelbestimmungen in die Vertiefungen pipettieren
2. Streifen abdecken und **1 Stunde** bei Raumtemperatur (18-26°C) unter Schütteln inkubieren
3. Inhalt der Platte verwerfen und **5 x mit je 250 µl** verdünntem Waschpuffer waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen
4. **100 µl CONJ** (Konjugat) pro Vertiefung pipettieren
5. Streifen abdecken und **1 Stunde** bei Raumtemperatur (18-26°C) unter Schütteln inkubieren
6. Inhalt der Platte verwerfen und **5 x mit je 250 µl** verdünntem Waschpuffer waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen

7. **100 µl SUB** (Substrat) pro Vertiefung pipettieren
8. **10 - 20 Minuten** bei Raumtemperatur (18-26°C) inkubieren
9. **50 µl STOP** (Stopplösung) pro Vertiefung zusetzen und im Mikrotiterplattenphotometer im Schüttelmodus kurz mischen
10. **Extinktion** sofort im Mikrotiterplattenphotometer mit einer Messwellenlänge von **450 nm** messen. Sofern die höchste Extinktion der Standards (**STD**) den Messbereich des Photometers übersteigt, sollte die Messung sofort bei einer Messwellenlänge von **405 nm** wiederholt und diese Ergebnisse für eine Auswertung herangezogen werden. Wenn möglich, sollten bei jeder Messung die Extinktionen der Messwellenlänge mit den Extinktionen einer Referenzwellenlänge verglichen werden. Zulässige Referenzwellenlängen sind z.B.: 595 nm, 620 nm, 630 nm, 650 nm und 690 nm.

11. 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. 0.01).

2. Punkt-zu-Punkt-Auswertung

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

3. Gewichtete Spline-Funktion

Für die optische Dichte empfehlen wir eine lineare Ordinate und für die Konzentration eine logarithmische Abszisse (bei einer logarithmischen Abszisse muss für den Standard mit der Konzentration 0 ein Wert kleiner 1 eingegeben werden z. B. 0.01).

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.

12. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben mit hohen Zonulin Konzentrationen, die außerhalb des Messbereichs liegen, sollen mit EXBUF (Extraktionspuffer; EDTA-Plasma und Serum) oder Stuhlverdünnungspuffer (Stuhl) verdünnt und nochmals bestimmt werden.

13. QUALITÄTSKONTROLLE

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

Erwartete Ergebnisse

EDTA-Plasma und Serum

Die ermittelten Werte werden mit **Verdünnungsfaktor 2** multipliziert um die tatsächliche Zonulin-Konzentration der Proben zu bestimmen.

Stuhlproben

Die ermittelte Zonulin-Konzentration der Stuhlprobe wird auf Grund der Probenvorbereitung mit **Verdünnungsfaktor 50** multipliziert.

Normbereich

Wir empfehlen jedem Labor einen eigenen Normwertbereich zu etablieren.

14. LITERATUR

1. Wang W, Uzzau S, Goldblum SE, Fasano A. Human zonulin, a potential modulator of intestinal tight junctions. *J Cell Sci* 2000;113 Pt 24: 4435-40.
2. Fasano A. Intestinal zonulin: open sesame! *Gut* 2001; 49: 159-62.
3. Fasano A, Not T, Wang W et al. Zonulin, a newly discovered modulator of intestinal permeability, and its expression in celiac disease. *Lancet* 2000; 355(9214): 1518-19.
4. Thomas KE, Sapone A, Fasano A, Vogel SN. Gliadin stimulation of murine macrophage inflammatory gene expression and intestinal permeability are MyD88-dependent: role of the innate immune response in Celiac disease. *J Immunol* 2006; 176: 2512-21.
5. Freemark M, Lynne LL. Screening for Celiac Disease in Children with Type 1 Diabetes. *Diabetes Care* 2003; 26: 1932-39.
6. Lazzarotto F, Basso D, Plebani M et al. Celiac Disease and Type 1 Diabetes. *Diabetes Care* 2003; 26: 248-49.
7. Watts T, Berti I, Sapone A et al. Role of the intestinal tight junction modulator zonulin in the pathogenesis of type 1 diabetes in BB diabeticprone rats. *Proc Nat Acad Sci USA* 2005; 102(8): 2916-21.
8. Sapone A, de Magistris L, Pietzak M, Clemente MG, Tripathi A, Cucca F, Lampis R, Kryszak D, Carteni M, Generoso M, Iafusco D, Prisco F, Laghi F, Riegler G, Carratu R, Counts D, Fasano A. Zonulin upregulation is associated with increased gut permeability in subjects with type 1 diabetes and their relatives. *Diabetes* 2006; 55: 1443-9.
9. De Magistris MT. Zonula occludens toxin as a new promising adjuvant for mucosal vaccines. *Vaccine* 2006;24 Suppl 2: S2-60-1.

15. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich für Forschungszwecke verwendet werden.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- Die charakteristischen Testdaten wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten wurden firmenintern festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik 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 zurück zu senden.

Verwendete Symbole:

Temperaturbegrenzung



Bestellnummer



In-Vitro-Diagnostikum

Inhalt ausreichend für <n>
Prüfungen

Hersteller



Verwendbar bis



Chargenbezeichnung



Nur für Forschungszwecke

Zonulin ELISA Kit

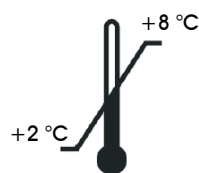
***For the in vitro determination of Zonulin in serum, EDTA-plasma
and stool***

For research use only

Valid from 05.01.2011



K 5600



1. INTENDED USE

The *Immundiagnostik* Assay is intended for the quantitative determination of zonulin in serum, EDTA-plasma and stool. For research use only.

2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

Zonulin is a novel human protein analogue to the *Vibrio cholerae* derived Zonula occludens toxin, which participates in tight junctions between cells of the wall of the digestive tract. Zonulin binds to a specific receptor on the surface of intestinal epithelia and triggers a cascade of biochemical events which induces tight junction disassembly and a subsequent permeability increase of the intestinal epithelia, allowing some substances to pass through and activate immune reactions.

Dr. Fasano and his co-workers found out that the zonulin-zonulin-receptor-system is more activated in celiac disease and type 1 diabetes mellitus patients. Patients with active celiac disease showed higher levels of zonulin and anti-zonulin antibodies compared to non-celiac patients and patients in remission, who were eating a gluten-free diet.

Concerning the autoimmune type 1 diabetes, in experiments with rats could be demonstrated, that elevated zonulin levels as well as increased intestinal permeability precede a type 1 diabetes disease. Conversely, type 1 diabetes could be prevented by inhibition of zonulin in animal experiments.

In addition, it was reported that many people who suffer from celiac disease also suffer from other autoimmune disorders. It is suggested that increased levels of zonulin are a contributing factor to the development of celiac disease and other autoimmune disorders such as insulin dependent diabetes, multiple sclerosis, and rheumatoid arthritis

3. PRINCIPLE OF THE TEST

This enzyme immuno assay can be used for the quantitative determination of Zonulin in serum, EDTA-plasma or stool.

The assay is based on the method of competitive enzyme linked immunoassays. As a first preparation step, a biotinylated zonulin tracer is added to the samples, standards and controls. Afterwards, aliquots of the treated preparations are transferred and incubated in microtiter plate wells coated with polyclonal anti zonulin antibodies. During the incubation, the free target antigen in the samples competes with the biotinylated zonulin tracer for the binding of the polyclonal anti zonulin antibodies immobilized on the microtiter plate wells. During a second incubation step, a streptavidin-labeled-peroxidase antibody, which binds to the biotinylated zonulin tracer, is added into each microtiter well. After washing the unbound components, the peroxidase substrate tetramethylbenzidine (TMB) is added. 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 zonulin concentration in the sample; this means, high zonulin concentration in the sample reduces the concentration of the biotinylated zonulin tracer bound to the immobilized anti zonulin 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.

4. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No	Label	Kit Components	Quantity
K 5600MTP	MTP	Microtiter plate, precoated	12 x 8 wells
K 5600WP	WASHBUF	BM-wash buffer concentrate 10 x	2 x 100 ml
K 5600TR	TRACER	Tracer, biotinylated Zonulin	1 x 200 µl
K 5600K	CONJ	Conjugate, Streptavidin-labeled-peroxidase	1 x 200 µl
K 5600ST	STD	Standards (lyophilized)	2 x 7 vials
K 5600KO1	CTRL	Control (lyophilized)	2 x 1 vial
K 5600KO2	CTRL	Control (lyophilized)	2 x 1 vial
K 5600TMB	SUB	TMB substrate (Tetramethylbenzidine)	1 x 15 ml
K 5600AC	STOP	ELISA stop solution, ready to use	1 x 15 ml

5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultra pure water*
- Precision pipettors and disposable tips to deliver 10-1000 µl
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- A multi-channel dispenser or repeating dispenser
- Eppendorf-cups, 1,5 ml
- 15 ml tubes (e. g. Falcon)
- Vortex-Mixer
- Standard laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader at 450 nm

*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).

6. 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.
- The **WASHBUF** (BM wash buffer concentrate) should be diluted with ultra pure water **1:10** before use (100 ml WASHBUF + 900 ml ultra pure water), mix well. Crystals can occur due to high salt concentration in the stock solutions. The crystals must be redissolved at 37°C in a water bath before dilution of the buffer solutions. The **WASHBUF** is stable at **2-8°C** until the expiry date stated on the label. **Diluted buffer solution** can be stored in a closed flask at **2-8°C for one month.**
- The lyophilized **STD** (standards) and **CTRL** (controls) must be reconstituted with **500 µl** aqua bidest. Allow the vial content to dissolve for 10 minutes and mix thoroughly by gentle inversion to insure complete reconstitution. **Reconstituted standards and controls can be stored at -20°C for one month. Avoid repeated freeze-thaw cycles.**
- The **TRACER** (biotinylated Zonulin-Tracer) must be diluted **1:100** in **wash buffer** (150 µl TRACER + 14.850 ml wash buffer). The **TRACER** (biotinylated Zonulin-Tracer) is stable at **2 -8 °C** until expiry date given on the label. **Diluted TRACER is not stable and cannot be stored.**
- The **CONJ** (Conjugate) must be diluted **1:100** in **wash buffer** (100 µl CONJ + 9.9 ml wash buffer). The **CONJ** (Conjugate) is stable at **2 -8 °C** until expiry date given on the label. **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.**

7. PRECAUTIONS

- 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.
- Stop solution is composed of sulfuric acid, which is a strong acid. Even diluted, it still must be handled with care. It can cause acid burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spills should be wiped out immediately with copious quantities of water.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on the kit label.

8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

EDTA-Plasma and Serum

Store samples until use at -20 °C.

Pipette **75 µl of each freshly collected EDTA-plasma or serum sample** in labeled Eppendorf-cups. Add to each sample **75 µl of wash buffer** and **150 µl of TRACER**, vortex well.

Dilution factor 1:2

Extraction of the stool sample

1a. Stool Sample Application System (SAS) (Cat. No.: K 6998SAS)

Stool sample tube – Instruction for use

Please note that the dilution factor of the final stool suspension depends on the used amount of stool sample and the volume of the buffer.

SAS with 0.75 ml Buffer:

Applied amount of stool:	15 mg
Buffer Volume:	0.75 ml
Dilution Factor:	1:50

Wash buffer is used as extraction buffer.

Please follow the instructions for the preparation of stool samples using the SAS as follows:

- a) The raw Stool Sample has to be thawed. For remarkably inhomogeneous samples we recommend a mechanical homogenisation using an applicator, inoculation loop or similar device.
 - b) **Fill the empty sample tube** with **0.75 ml** of ready-to-use extraction buffer before using it with the sample. Important: Allow the extraction buffer to reach room temperature.
 - c) Unscrew the tube (yellow part of cap) to open. Insert yellow dipstick into sample. The lower part of the dipstick exhibits notches which need to be covered completely with stool after inserting it into the sample. Place dipstick back into the tube. When putting the stick back into the tube, excess material will be stripped off and leave 15 mg of sample to be diluted. Screw tightly to close the tube.
 - d) Shake the tube well until no stool sample remains in the notches. Important: Please make sure that you have a maximally homogenous suspension after shaking. Especially with more solid samples, soaking the sample in the tube with buffer for app. 10 minutes improves the result.
 - e) Allow sample to stand for app. 10 minutes until sediment has settled down. Floating material like shells of grains can be neglected.
 - f) Carefully unscrew the complete cap of the tube including the turquoise ring plus the dipstick. Discard cap and dipstick. Make sure, the sediment will not be dispersed again.
- 1b. Sample preparation kit from Roche Diagnostics, Mannheim, Germany (Cat. No. 10 745 804 322)**
- Alternatively, other stool sample preparation kits (e.g. Sample preparation kit from Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) can be used. In the Roche sample preparation kit, 100 mg of stool sample are suspended in 5 ml of extraction buffer using a vibrator mixer (e.g. Vortex mixer). Centrifugation of the suspension is recommended.
- Pipette **150 µl of each stool sample supernatant** and **150 µl of TRACER** in Eppendorf-cups and mix well.

Dilution Factor (1a. or 1b.):

1:50

9. STANDARD AND CONTROL PREPARATION

Transfer **150 µl of STD or CTRL** in the corresponding Eppendorf-cups, add **150 µl of TRACER** and mix well.

10. ASSAY PROCEDURE

Procedural notes

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay.
- Substrate solution should remain colorless until use.
- To ensure accurate results, proper adhesion of plate sealers during incubation steps is necessary.
- Avoid foaming when mixing reagents.
- The assay should always be performed according the enclosed manual.

Test procedure

Prior to use in the assay allow all reagents and samples to come to room temperature (18-26 °C) and mix well.

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.

Wash the PLATE (precoated microtiter plate) 5 x with 250 µl ELISA diluted wash buffer. After the final washing step remove residual buffer by tapping the plate on absorbent paper.

Carry out the tests in duplicate.

1. Add **100 µl** of the pre-treated **STD** (standards), **CTRL** (controls) or **samples** into each well in duplicate
2. Cover the strips and incubate for **1 hour** shaking on a horizontal mixer at room temperature (18-26°C)
3. Aspirate the contents of each well. Wash the microtiter plate **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 to remove excess solution
4. Add **100 µl** of **CONJ** (conjugate) into each well
5. Cover the strips and incubate for **1 hour** shaking on a horizontal mixer at room temperature (18-26°C)
6. Aspirate the contents of each well. Wash the microtiter plate **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 to remove excess solution
7. Add **100 µl** of **SUB** (substrate solution) into each well

8. Incubate for **10 - 20 minutes** at room temperature (18-26°C)
9. Add **50 µl** of **STOP** (stop solution) into each well and mix shortly in the ELISA reader using the shake option
10. Determine **absorption** immediately with an ELISA reader at **450 nm**. If the highest extinction of the standards (**STD**) is above the range of the photometer, absorption must be measured immediately at **405 nm** and the obtained results used for evaluation. If possible, the extinctions from each measurement should be compared with extinctions obtained at a reference wavelength, e. g. 595 nm, 620 nm, 630 nm, 650 nm and 690 nm can be used.

11. 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 calibrator must be specified with a value less than 1 (e. g. 0.01).

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 logarithmic abscissa for the concentration. When using a logarithmic abscissa, the zero calibrator must be specified with a value less than 1 (e. g. 0.01).

The plausibility of the pairs of values should be examined before the automatic evaluation of the results. If this option is not available with the used program, a control of the paired values should be done manually.

12. LIMITATIONS

If the absorption of any sample is outside the measurement range, the sample should be diluted with EXBUF (extraction buffer; EDTA-plasma and serum) or stool dilution buffer (stool) and re-assayed.

13. QUALITY CONTROL

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 sample are outside the acceptable limits.

Expected values

EDTA-Plasma and Serum

A **dilution factor of 2** is used to obtain the Zonulin concentration of the samples.

Stool samples

To obtain the Zonulin concentration in stool samples, multiply the estimated value by the **dilution factor of 50**.

Normal range

We recommend each laboratory to establish its own baseline values.

14. REFERENCES

1. Wang W, Uzzau S, Goldblum SE, Fasano A. Human zonulin, a potential modulator of intestinal tight junctions. *J Cell Sci* 2000;113 Pt 24: 4435-40.
2. Fasano A. Intestinal zonulin: open sesame! *Gut* 2001; 49: 159-62.
3. Fasano A, Not T, Wang W et al. Zonulin, a newly discovered modulator of intestinal permeability, and its expression in celiac disease. *Lancet* 2000; 355(9214): 1518-19.
4. Thomas KE, Sapone A, Fasano A, Vogel SN. Gliadin stimulation of murine macrophage inflammatory gene expression and intestinal permeability are MyD88-dependent: role of the innate immune response in Celiac disease. *J Immunol* 2006; 176: 2512-21.
5. Freemark M, Lynne LL. Screening for Celiac Disease in Children with Type 1 Diabetes. *Diabetes Care* 2003; 26: 1932-39.
6. Lazzarotto F, Basso D, Plebani M et al. Celiac Disease and Type 1 Diabetes. *Diabetes Care* 2003; 26: 248-49.

7. Watts T, Berti I, Sapone A et al. Role of the intestinal tight junction modulator zonulin in the pathogenesis of type 1 diabetes in BB diabeticprone rats. *Proc Nat Acad Sci USA* 2005; 102(8): 2916-21.
8. Sapone A, de Magistris L, Pietzak M, Clemente MG, Tripathi A, Cucca F, Lampis R, Kryszak D, Carteni M, Generoso M, lafusco D, Prisco F, Laghi F, Riegler G, Carratu R, Counts D, Fasano A. Zonulin upregulation is associated with increased gut permeability in subjects with type 1 diabetes and their relatives. *Diabetes* 2006; 55: 1443-9.
9. De Magistris MT. Zonula occludens toxin as a new promising adjuvant for mucosal vaccines. *Vaccine* 2006;24 Suppl 2: S2-60-1.

15. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- All reagents in the kit package are for research use only.
- Guidelines for medical laboratories should be observed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which is not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage resulting from wrong use.
- Warranty claims and complaints in respect of deficiencies must be logged within 14 days after receipt of the product. The product shall be send to Immundiagnostik AG along with a written complaint.

Used symbols:



Temperature limitation



Catalogue Number



In Vitro Diagnostic Medical Device



Contains sufficient for <n> tests



Manufacturer



Use by



Lot number



For research use only